

Université de Montréal

**Étude des propriétés immunogènes de la protéine F du virus de  
l'hépatite C chez la souris.**

par  
Stéphanie Lamarche

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue d'obtention du grade de Maîtrise en Sciences

septembre, 2007

©, Stéphanie Lamarche, 2007





## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude des propriétés immunogènes de la protéine F du virus de  
l'hépatite C chez la souris.**

présenté par :  
Stéphanie Lamarche

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hugo Soudeyns, Ph.D.  
directeur de recherche

Idriss Dijali-Saiah, Ph.D.  
président-rapporteur

Naglaa Shoukry, Ph.D  
membre du jury

## RÉSUMÉ

**Introduction :** On estime que près de 170 millions de personnes sont infectées par le virus de l'hépatite C (VHC). Ce virus induit une maladie chronique et des séquelles graves chez près de 85% des personnes atteintes. Puisque le traitement standard (IFN- $\alpha$  pegylé et ribavirine) n'a qu'un taux de succès limité, il serait souhaitable de développer un vaccin préventif et/ou thérapeutique. *L'alternate reading frame protein* (ARFP) du VHC est une petite protéine hautement conservée encodée dans un cadre chevauchant celui de la protéine de la nucléocapside. Des réponses humorales et cellulaires dirigées contre cette protéine ont été observées chez des patients infectés par des souches de VHC de tous les génotypes, ce qui indique qu'elle est produite *in vivo*.

**Méthodologie :** Nous avons évalué l'immunogénicité de l'ARFP dans le contexte de deux plateformes vaccinales expérimentales et avons identifié des épitopes LTC restreints par HLA-A\*0201. La première plateforme consiste en une protéine recombinante administrée à des souris C57Bl/6. La deuxième plateforme est un vaccin à ADN qui a été inoculé à des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1.

**Résultats :** L'ARFP est un immunogène efficace capable de stimuler les branches humorales et cellulaires (Th1 et Th2) de la réponse immunitaire et peut conférer un certain degré de protection contre un challenge *vaccinia* ARFP-recombinant. La cartographie peptidique a permis l'identification de nouveaux épitopes minimaux A2-restreints pouvant potentiellement être ciblés par les LTC.

**Conclusion :** L'ARFP s'avère un candidat intéressant pour le développement d'un vaccin préventif et/ou thérapeutique contre le VHC.

**Mots clés :** ARFP, virus de l'hépatite C, vaccin, épitopes lymphocytes T cytotoxiques

## ABSTRACT

**Background:** It is estimated that close to 170 million people are infected with hepatitis C virus (HCV). This virus induces a chronic disease state with serious health consequences in up to 85% of people who become infected with it. As standard treatment (pegylated IFN- $\alpha$  and ribavirin) has at best a 50% success rate, it would be advantageous to develop a prophylactic and/or therapeutic vaccine against HCV. Alternate reading frame protein (ARFP) is a small, highly conserved protein encoded in a reading frame overlapping that of the HCV nucleocapsid protein. Both humoral and cellular responses directed towards the ARFP have been detected in patients infected with HCV of all different genotypes, indicating that the ARFP is expressed *in vivo* during HCV infection.

**Methodology:** We have sought to evaluate the immunogenicity of ARFP by using two experimental vaccine platforms and by identifying HLA-A\*0201 restricted CTL epitopes. The first platform is a recombinant protein vaccine administered to C57Bl/6 mice. The second is a DNA vaccine that was inoculated into DBA/2 mice transgenic for HLA-DR and HLA-A\*0201. CTL epitopes were evaluated using a MHC class I binding assay.

**Results:** ARFP is a potent immunogen, capable of stimulating both the humoral and cellular arms (Th1 and Th2) of the immune response, as well as conferring a certain degree of protection against an ARFP-recombinant *vaccinia* virus challenge. Peptide mapping assays led to the identification novel HLA-A\*0201 restricted epitopes.

**Conclusion:** ARFP represents an interesting candidate for the development of a prophylactic and/or therapeutic vaccine against HCV.

**Keywords:** ARFP, hepatitis C virus, vaccine, cytotoxic T lymphocytes epitopes

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS ET MOTS CLÉS	iii
ABSTRACT AND KEYWORDS	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	x
PUBLICATIONS	xiii
DÉDICACE ET REMERCIEMENTS	xiv
 CHAPITRE I – REVUE DE LA LITTÉRATURE	 1
1.1 Introduction	2
1.1.1. Historique	2
1.1.2. Transmission	3
1.1.3. Épidémiologie	4
1.1.4. Diversité génomique	5
1.1.5. Pathogenèse	5
1.1.6. Traitements	6
1.1.7. Modèles d'étude	6
1.2. Le VHC	9
1.2.1. Biologie moléculaire du VHC	9
1.2.2. Les régions non-codantes	9
1.2.3. Les protéines structurales	10
Core	10
Les glycoprotéines E1 et E2	10
p7	11
1.2.4. L'entrée virale et la réplication	12
1.2.5. Les protéines non-structurales	14
NS2	14
NS3/NS4A	14
NS4B	15
NS5A	15
NS5B	16
1.3. La réponse immunitaire	18
1.3.1. Contexte	18
1.3.2. La réponse innée	18
1.3.3. La réponse humorale	20
1.3.4. La réponse cellulaire	21
1.4. Vaccins	23
1.4.1. Développement de vaccin	23
1.4.2. Protéine recombinante	24
1.4.3. Virus-Like Particles (VLP)	26
1.4.4. Virus recombinants	26
1.4.5. Vaccin à ADN	27

1.4.6. Vaccin peptidique	28
1.5 L'ARFP/F	29
1.5.1. Historique	29
1.5.2. Séquençage	29
1.5.3. Biologie moléculaire et synthèse	30
1.5.4. Fonction biologique	33
1.5.5. Réponses immunitaires spécifique pour l'ARFP	35
OBJECTIFS	37
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
CHAPITRE III : RÉSULTATS	60
CHAPITRE IV : DISCUSSION	100
1. Récapitulation	101
2. Vaccin protéique	101
3. Vaccin à ADN	103
4. Épitopes minimaux	105
5. Directions futures	106
CONCLUSIONS	108
BIBLIOGRAPHIE	110
ANNEXE 1 – Données ELISA vaccin protéique. Protocoles 1-4.	
ANNEXE 2 – Comparaison des courbes d'efficacité d'immunisation pour le vaccin protéique. Protocoles 1-3.	
ANNEXE 3 – Comparaison des résultats obtenus par test de plaque et qPCR. Protocoles 3 et 4.	
ANNEXE 4 – Analyse des peptides F37-51 et F101-115 par génotype de VHC	



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 – Virus des hépatites	2
Tableau 1.2 – Agents anti-VHC en voie de développement	17
Tableau 2.1 – Protocoles d’immunisation vaccin protéique	47
Tableau 2.2 – Protocole d’immunisation 5 – vaccin à ADN	49
Tableau 2.3 – Protocole d’immunisation 6 – Vaccin à ADN	50
Tableau 2.4 – Protocole d’immunisation 7 – Vaccin à ADN	51

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 – Prévalence mondiale du virus de l'hépatite C	4
Figure 1.2 – Organisation de la polyprotéine du VHC	9
Figure 1.3 – Organisation des protéines du VHC en relation avec la membrane du réticulum endoplasmique.	12
Figure 1.4 – Cascades TLR3 et RIG-I et leur implication dans l'immunité innée	19
Figure 1.5 – Les trois mécanismes proposés pour la production de l'ARFP	31
Figure 2.1 – Organigramme des protocoles d'immunisation du vaccin protéique	46
Figure 3.1 - Expression de l'ARFP dans des cellules CV1 infectées avec le <i>vaccinia</i> ARFP-recombinant (vvARFP). Immunobuvardage	62
Figure 3.2 - Expression de l'ARFP dans des cellules CV1 infectées avec le <i>vaccinia</i> ARFP-recombinant (vvARFP). Immunofluorescence	63
Figure 3.3 - Études d'immunisations ARFP chez la souris C57Bl/6.	67
Figure 3.4 - Isotypage des réponses IgG anti-ARFP des souris C57Bl/6 immunisées avec la rARFP.	68
Figure 3.5 - Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ des splénocytes des souris C57Bl/6 du protocole 4.	71
Figure 3.6 - Protection contre un challenge <i>vaccinia</i> chez les souris immunisées. Protocole 3.	74
Figure 3.7 - Protection contre un challenge <i>vaccinia</i> chez les souris immunisées. Protocole 4.	75
Figure 3.8 - Protection contre un challenge <i>vaccinia</i> chez des souris C57Bl/6 immunisées. Protocoles 3 et 4.	76
Figure 3.9 - Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1 immunisées avec des vecteurs à ADN exprimant l'ARFP.	79
Figure 3.10 - Prolifération des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1 immunisées avec des vecteurs à ADN exprimant l'ARFP.	80

Figure 3.11 - Expression de l'ARFP dans des cellules HEK 293 transfectées avec le vecteur pMASIA-F - Immunobuvardage.	82
Figure 3.12 - Expression de l'ARFP du vecteur à ADN pMASIA-F dans les cellules HEK 293 – Immunofluorescence indirecte.	83
Figure 3.13 - Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1. Protocole 6 : prime-boost.	86
Figure 3.14 - Prolifération des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1 immunisées. Protocole 6 : prime-boost.	87
Figure 3.15 - Production d'IgG totale des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1 pour le protocole 6 (prime-boost) avec le vecteur à ADN pMASIA-F.	88
Figure 3.16 - Titres d'anticorps anti-ARFP chez les souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1. Protocole 7.	91
Figure 3.17 - Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1. Protocole 7.	92
Figure 3.18 - Prolifération des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1. Protocole 7.	93
Figure 3.19 - Protection des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A*0201/HLA-DR1 contre un challenge <i>vaccinia</i> . Protocole 7.	94
Figure 3.20 - Test de liaison peptidique pour déterminer l'effet du DTT.	97
Figure 3.21 - Analogues de peptides.	98
Figure 3.22 - Cartographie des analogues ARFP additionnels.	99

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ad 5/6 : Adénovirus de type 5/6

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AiF : Adjuvant incomplet de Freund

ALT : Alanine aminotransférase

ARFP : *Alternate Reading Frame Protein* (protéine dans un cadre de lecture alternatif)

ARN : Acide ribonucléique

ASGPr : asialoglycoprotéine

AST : Aspartate aminotransférase

BSA : *Bovine Serum Albumin*

CMH de classe I/II : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CpG : Cytidine-phosphate-guanosine

DTT : Dithiothreitol

EBV : Epstein Barr virus

EL1 : *Extracellular loop 1* (boucle extracellulaire 1)

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELIspot : *Enzyme-Linked Immunospot Assay*

GBV : *GB virus* (virus GB)

HCV-LP : *Hepatitis C virus-like particle*

HCVpp : *Hepatitis C virus pseudoparticle* (pseudoparticule du virus de l'hépatite C)

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

HVR [1, 2, 3] : *Hypervariable Region [1, 2, 3]* (region hypervariable [1, 2, 3])

IFN : Interféron

IFN- $\gamma$  : Interféron gamma

IL : Interleukine

IRES : *Internal Ribosome Entry Site* (site interne d'entrée ribosomale).

IRF3 : *Interferon Regulatory Factor 3* (facteur de régulation d'interféron 3)

IS : Indice de stimulation

LDLr : Low Density Lipoprotein receptor (récepteur de lipoprotéine à faible densité)

LTC : Lymphocytes T cytotoxiques

MFI : *Mean Fluorescence Intensity*

MVA : *Modified Vaccinia Ankara*

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NK : *Natural Killer* (tueuses naturelles)

NKT : *Natural Killer T cell* (lymphocytes tueuses naturelles T)

NS : *Non structural* (non-structural)

OAS : *Oligoadenylate synthetase*

ODN : Oligodésoxyribonucléotides

OMS : Organisation mondiale de Santé

ORF : *Open Reading Frame*

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction polymérase en chaîne)

PFD : Préfoldine

PFD2 : Sous-unité 2 de la préfoldine

Pfu : *Plaque forming unit* (unité formatrice de plaque)

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction (réaction polymérase en chaîne quantitative)

rARFP : *recombinant Alternate Reading Frame Protein* (ARFP recombinant)

RE : Réticulum endoplasmique

RIG-I : *Retinoic acid Inducible Gene I*

SCID : *Severe Combined Immunodeficiency*

SFC : *Spot Forming Cells* (cellules formatrices de spots)

siRNA : small interfering RNA (petit ARN interférant)

SR-B1 : *Scavenger Receptor B1*

Tg : Transgénique

Th : *T helper*

TLR3 : *Toll Like Receptor 3*

TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (facteur de nécrose  $\alpha$ )

UTR : *Untranslated Region* (région non-traduite)

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VLP : *Virus-Like Particle* (pseudo particule virale)

VSV : *Vesicular Stomatitis Virus* (virus de la stomatite vésiculaire)

vvARFP : Virus de la vaccine recombinant pour l'ARFP

vvWR : Virus de la vaccine de la souche *Western Reserve* (type sauvage)

## PUBLICATIONS

Comparative evaluation of alternate reading frame protein-specific immune responses elicited by protein and DNA vaccination in mice (en préparation).

Stéphanie Lamarche, Sophie Canobio, Christian Savard, Denis Leclerc, Qiang Liu, Hugo Soudeyns.

## DÉDICACE ET REMERCIEMENTS

Écrire ce mémoire de maîtrise et la réalisation de mon projet de recherche a été un travail d'endurance qui n'aurait pas été possible sans la participation et le soutien de plusieurs personnes.

Je veux en premier remercier mon directeur de recherche, le Dr. Hugo Soudeyns, pour son appui constant, son encadrement et pour sa très grande patience.

Ensuite, je ne veux pas oublier mes collaborateurs sur ce projet : Dr. Denis Lerclerc et Christian Savard au Centre Hospitalier de l'Université de Laval à Sainte-Foy pour leur participation sur le volet du vaccin protéique; Dr. Qiang Liu et Lucy Liu au *Vaccine and Infectious Disease Organization* à Saskatoon pour leur participation sur le volet du vaccin à ADN.

À ce point je voudrais remercier mes collègues du laboratoire au Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, sans lesquels je n'aurais pas pu compléter ce projet : Sophie Canobio pour son encadrement durant les premiers mois de mon projet, Reginald Renous pour tout son aide, et, Martine Caty et Natacha Merindol pour leurs conseils et pour m'avoir prêté une oreille attentive.

Enfin je tiens à remercier ma famille pour leur patience et surtout pour leur support sans faille : ma mère Suzanne, mon père Michel, mes frères Paul et Nicolas, mes sœurs Julie et Sarah, ma cousine/colocataire Allison, Penny, et mes grand-mères Bernadette Alleyn et Huberte Lamarche pour leur intérêt soutenu.

Merci à tous ceux dont j'aurais oublié le nom, mais qui ont participé de près ou de loin à ce projet.



## **Chapitre I : Revue de la littérature**

## 1 – Introduction

### 1.1.1. Historique

On donne le nom d'« hépatite » à toute maladie qui mène à l'inflammation du foie. Plusieurs virus peuvent causer cette condition. Les herpesvirus, le virus Epstein-Barr (EBV) et le cytomégalovirus (CMV) n'ont pas un tropisme spécifique aux hépatocytes mais ils peuvent causer une inflammation transitoire du foie sans aucune pathologie permanente (*Microbiology 5<sup>ième</sup> édition*, p.889, Prescott Harley Klein, 2002). Parmi les huit virus ayants un tropisme pour les hépatocytes, il y en a seulement cinq qui sont bien caractérisés et qui sont dénommés virus de l'hépatite A, B, C, D et E (Tableau 1.1). Les trois autres (F, G et TTV) ont été découverts récemment et ne sont pas bien caractérisés (Tableau 38.4, *Microbiology 5<sup>ième</sup> édition*, Prescott Harley Klein, 2002). Le virus de l'hépatite C (VHC) a été découvert en 1989 avec l'isolation d'un clone ADNc identifié comme étant l'agent responsable pour la majorité des cas d'hépatite non-A-non-B (NANB) associés à la transfusion sanguine (Choo et al. 1989).

**Tableau 1.1 – Virus des hépatites**

Virus	Génome	Classification
Hépatite A	ARN	Picornaviridae, Hepatovirus
Hépatite B	ADN	Hepadnaviridae, Orthohepadnavirus
Hépatite C	ARN	Flaviviridae, Hepacivirus
Hépatite D	ARN	Non classifié
Hépatite E	ARN	Hepeviridae

Information provenant du site du comité international sur la taxonomie des virus  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>

### 1.1.2. Transmission

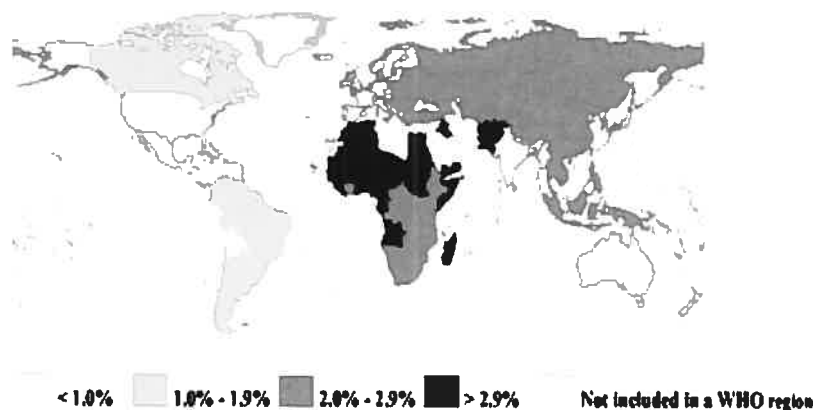
La transmission du VHC se fait principalement par exposition percutanée directe, soit par transfusion sanguine ou par des seringues contaminées. En Amérique du Nord, les cas associés avec la transfusion sanguine ont diminué d'une façon dramatique suite au déploiement d'un système de dépistage (banques de sang à contribution volontaire, questionnaires évaluant facteurs de risques, tests anti-VHC etc.). Ceci dit, la transfusion sanguine reste un moyen de transmission important dans les pays en développement où les ressources pour ce genre de système ne sont pas disponibles (Shepard et al. 2005). Le mode de transmission le plus prévalent dans les pays développés est maintenant la transmission par seringues contaminées, surtout chez les utilisateurs de drogues injectables (Dalgard et al. 2003; Balogun et al. 2003; Shepard et al. 2005), chez qui les taux de séropositivité peuvent atteindre 90% (Alter MJ 1997). Dans les pays en développement, l'utilisation de seringues d'une façon non stérile est responsable d'une grande proportion des nouvelles infections. En fait, une étude faite par l'OMS en 2000 rapporte que la pratique non stérile avec les seringues a été responsable d'environ 2 millions des nouveaux cas cette année là en particulier (Hauri et al. 2004).

La transmission périnatale (de la mère à l'enfant) survient à une fréquence de 2.7-8.4% des enfants nés d'une mère infectée par le VHC. Les taux de transmission sont plus élevés chez les femmes co-infectées avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (jusqu'à 15%) (Thomas et al., 1998; Dal Molin et al., 2002). Il existe d'autres modes de transmission, par exemple par contact sexuel, ou occupationnel, mais ils sont plus rares et l'infection semble être moins efficace dans ces contextes (Shepard et al., 2005).

### 1.1.3. Épidémiologie

Le VHC est endémique à l'échelle mondiale, mais sa distribution géographique reste très variable (Figure 1.1). On retrouve dans les pays développés des taux de séroprévalence beaucoup plus faibles (comparativement aux pays en développement), variant entre 0.63% en Allemagne (Palitzsch et al. 1999) et 2.2% en Italie (Puro et al. 1995). Dans les pays en développement, les taux sont passablement plus élevés. Par exemple, en Chine, 3.2% (Shepard et al. 2005) de la population est séropositive (la Chine compte pour 20% de la population mondiale). L'Égypte a le plus haut taux enregistré avec 22% de sa population de 73 million infectée par le VHC (Frank et al. 2000). Ces taux plus élevés sont associés avec des pratiques thérapeutiques non sanitaires : réutilisation de seringues jetables, non stérilité de seringues en verre, visite chez un pratiquant de médecine non licencié (Lin et al. 2003). Le cas particulier de l'Égypte serait attribué à la campagne de vaccination thérapeutique contre la schistosomiase de 1960 à 1987 (Frank et al. 2000).

**Figure 1.1 : Prévalence mondiale du virus de l'hépatite C**



*Tiré de The Journal of Clinical Pharmacology, 2004; 44:20-29*

#### **1.1.4. Diversité génomique**

Le VHC est un virus avec une diversité génétique impressionnante. On compte six génotypes majeurs, plus de 50 sous-types et, chez un même individu, il peut y avoir plusieurs centaines de variants (quasi-espèces) (Simmonds et al., 2005).

#### **1.1.5. Pathogenèse**

Certaines études estiment que jusqu'à 30% des nouveaux cas d'infection par le VHC peuvent présenter des symptômes dans la phase aiguë (Alter MJ 1997). Les symptômes peuvent inclure un malaise général, la faiblesse, l'anorexie et la jaunisse (Chen et al., 2006). Une augmentation des niveaux sériques d'alanine aminotransférase (ALT), indice de la mort hépatocellulaire, est quantifiable de 2 à 8 semaines suivant l'infection par le VHC. Il est estimé que 10-25% des personnes infectées vont développer une réponse immunitaire suffisante pour combattre l'infection (Seeff LB 1999; Chen et al. 2006), ce qui veut dire que 75-90% des patients qui acquièrent le VHC vont développer une maladie chronique, dont 20% de ceux-ci vont progresser à une cirrhose du foie (Seeff LB 1999; Chen et al. 2006; Dustin et Rice 2007). En fait, la cirrhose du foie causée par l'infection avec le VHC est responsable de la majorité des cas de carcinome hépatocellulaire et est l'indication majeure pour la transplantation du foie aux États-Unis (Levrero et al., 2006; NIH Concensus Statement for Management of HCV : 2002 ). La rapidité de la progression vers la cirrhose durant la phase chronique est déterminée par plusieurs facteurs, tels que l'âge à l'infection, la consommation d'alcool, le sexe male, la coinfection avec le virus de l'hépatite B ou le VIH, et le degré d'inflammation du foie (Alter MJ 1997, Chen et al. 2006). Quoique les statistiques ne soient pas concordantes (1% jusqu'à 74%), des manifestations extra hépatiques chez les

patients chroniques sont souvent rapportés (Blackard et al. 2006; Chen et al. 2006; Dustin et Rice. 2007), les plus communes étant la cryoglobulémie mixte, la glomerulonéphrite, des défauts lymphoprolifératifs et des problèmes neurologiques (Blackard et al. 2006). Les manifestations extrahépatiques présentes dans les organes lymphoïdes ou avec des effets auto-immunitaires suggèrent une capacité du virus de se répliquer, quoi que moins efficacement, dans des cellules autre que les hépatocytes. En effet, de l'ARN à sens négatif a été retrouvé dans les tissus du cerveau, les cellules dendritiques du sang périphérique, le pancréas, la glande thyroïde, la moelle osseuse, la rate et le fluide cervico-vaginal de patients infectés chroniquement par le VHC (Goutagny et al. 2003; Nowicki et al. 2005; Blackard et al. 2006).

#### **1.1.6. Traitements**

Le meilleur traitement disponible présentement consiste en une bithérapie avec l'interféron alpha pégylé et la ribavirine. Ce traitement donne une réponse virologique soutenue dans 40-50% des cas (Huang et al. 2006) chez les patients infectés avec le VHC de génotype 1 (génotype prédominant en Amérique du Nord et au Japon) et dans 80% des patients infectés avec les génotypes 2 et 3 (Cornberg et al. 2003). Il n'y a présentement aucun traitement préventif contre le VHC.

#### **1.1.7. Modèles d'étude**

Un facteur qui a considérablement ralenti la recherche concernant tous les domaines d'étude du VHC (entrée virale, réplication, thérapie) est l'absence d'un modèle de culture cellulaire ainsi qu'un modèle chez les petits animaux. Jusqu'à récemment, le meilleur modèle d'étude était le chimpanzé (Zhong et al. 2005).

Pour pallier au problème du manque de modèles *in vivo* pour étudier les mécanismes moléculaires d'infection avec le VHC, quelques techniques *in vitro* ont été créées dont les réplicons subgénomiques et les pseudoparticules de VHC.

Les réplicons subgénomiques consistent du génome du VHC moins les régions codantes pour les protéines structurales, celles-ci ayant été remplacées par *l'internal ribosomal entry site* (IRES) d'un autre virus et marqueur de sélection (Lohmann et al., 1999).

Les pseudoparticules de VHC, HCV-LP, sont des unités qui s'assemblent de manière autonome et ne contiennent aucun génome. Il s'agit des séquences de protéines structurales du VHC qui ont été injecté dans des cellules eucaryotes (insectes ou mammifères). Les lysats cellulaires sont ensuite purifiés pour obtenir les HCV-LP qui sont similaires aux virions isolés de patients infectés en ce qui concerne leur morphologie et leurs propriétés biochimiques (Baumert et al., 1998).

Les pseudoparticules infectieuses de VHC (HCVpp) représentent un autre modèle pour étudier les interactions entre le virus et la cellule de l'hôte (Bartosch et al., 2003b). Elles consistent en un vecteur d'expression des glycoprotéines de l'enveloppe du VHC les protéines core des lentivirus ou rétrovirus, un génome rétroviral ou lentiviral compétent pour l'encapsidation et un gène rapporteur pour aider à mesurer l'infectivité (Bartosch et al., 2006). Il existe un autre modèle employant un virus de la stomatite vésiculaire (VSV) qui exprime les glycoprotéines de l'enveloppe du VHC. Toutes ces méthodes ont été utiles pour l'identification de récepteurs cellulaires potentiels pour l'attachement et l'entrée virale, mais puisqu'ils ne contiennent pas les protéines non-structurales leur utilité est limitée.

Un modèle de souris Alb-uPA SCID a été développé pour les études d'histopathologie du foie. Ces souris SCID sont transgéniques pour quatre copies du gène codant pour l'urokinase, qui est sous le contrôle du promoteur de l'albumine (Alb-uPA). Ce gène cible la surproduction de l'urokinase, qui mène à la mort accélérée des hépatocytes. De ce fait, leur foie peut être reconstitué avec des cellules humaines (Mercer et al., 2001). Par contre, comme il s'agit des souris immunodéficientes elles ne peuvent pas être utilisées pour des études portant sur la réponse immunitaire.

Il y a aussi des souris transgéniques pour les molécules de CMH de classe 1 et de classe 2 (HLA-A2.1 et HLA-DR1 respectivement) qui ont été développées pour étudier les réponses immunitaires telles qu'elles le seraient chez l'humain. Les souris transgéniques pour HLA-A2.1 et HLA-DR1 ne peuvent pas être infectées par le VHC, par contre elles sont utiles dans le contexte de développement de vaccin (Pajot et al., 2004).

En 2005, trois équipes ont mis au point un système de culture cellulaire avec un réplicon du VHC de génotype 2 (JFH-1) capable de produire des virions infectieux dans la lignée cellulaire Huh7.5 (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Ces cellules ont une mutation ponctuelle dans le gène encodant le *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I), une hélicase d'ARN cytoplasmique, et donc sont plus permissives. Peu après, un système de culture cellulaire capable de produire des virions infectieux utilisant un réplicon du VHC de génotype 1 (H77) a été développé dans une lignée d'hépatocytes immortalisées (Kanda et al., 2006) et dans les cellules Huh7.5 (Yi et al., 2006).



## 2- Le VHC

### 1.2.1. Biologie moléculaire

Le VHC fait partie de la famille *Flaviviridae*, genre *hepacivirus*. C'est un virus enveloppé avec un génome à ARN simple brin de polarité positive. Le génome fait 9.6 Kb de long et la traduction de celui-ci produit une longue polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (Figure 1.2). Les 11 protéines virales sont produites par des événements de clivage co-traductionnels et post-traductionnels. Tout comme la plupart des virus à ARN, la polymérase du VHC (NS5B) ne possède pas d'activité de correction exogène et donc le génome du VHC est hautement mutable.

**Figure 1.2 : Organisation de la polyprotéine du VHC.** La flèche noire indique le clivage par la peptidase signal de l'hôte. Les croix rouges indiquent les sites de clivage de la peptidase signal du réticulum endoplasmique (RE).



### 1.2.2. Les régions non codantes

Le génome du VHC contient deux régions non codantes (UTR), un en 5' et l'autre en 3'. Ces deux régions sont hautement conservées parmi les différents isolats du VHC et la région 5' contient un site IRES qui est responsable de l'initiation de la traduction de l'ARN viral. La sous unité 40S du ribosome se lie à ce site et est mise en contact avec le codon AUG initiateur pour débiter la traduction de la polyprotéine d'un manière indépendante de la coiffe (Penin et al., 2004; Spahn et al., 2001).

### **1.2.3. Les protéine structurales**

Le VHC compte 4 protéines structurales : la protéine de la nucléocapside (core ou C), les glycoprotéines E1 et E2, et la protéine p7.

#### **La nucléocapside (core)**

La nucléocapside (core) est une protéine hautement basique et multifonctionnelle (Tellinghuisen et al., 2002; Lindenbach et al., 2005). Son extrémité N-terminale contient plusieurs motifs immunodominants tandis que son extrémité C-terminale est hydrophobe, lui permettant de former des associations avec des gouttelettes lipidiques (Penin et al. 2004). La protéine core mature est produite par deux événements de clivage protéolytique impliquant la peptidase signalale de l'hôte et la peptidase signalale du RE qui clive les séquences de signalisation entre core, E1, E2 (Penin et al., 2004) (Figure 1.2). La fonction principale de core est l'encapsulation du génome viral, mais elle sert aussi de facteur trans-modulateur qui stimule la traduction virale à partir de l'IRES (Boni et al. 2005). La protéine core a s'est vue attribuer beaucoup d'autres fonctions : la modulation des promoteurs de hTERT, de p53 (Ray et al., 1997) et de p21 (Ray et al., 1998), qui contrôlent le cycle cellulaire (Basu et al. 2004), ainsi que la protection contre la mort cellulaire induite par TNF $\alpha$  (Marusawa et al., 1999). Core a aussi été impliquée dans l'interférence avec le métabolisme lipidique, l'initiation de la stéatose et la carcinogenèse hépatocellulaire (Moriya et al., 1998; Lerat et al., 2002).

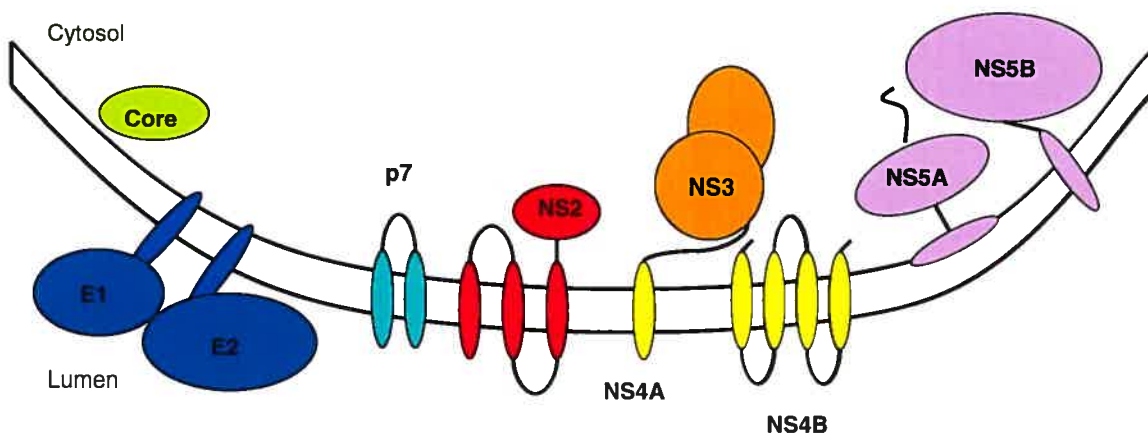
#### **Les glycoprotéines E1 et E2**

Les deux glycoprotéines de l'enveloppe virale sont dénommées E1 et E2. Ce sont des protéines transmembranaire de type 1 qui sont ancrées à la membrane du RE par leur C-terminal hydrophobe (Penin et al., 2004) (Figure 1.3). Suite au clivage par la peptidase

signal de l'hôte, des séquences de signalisation situées dans les ectodomaines des protéines E1 et E2 mènent à la formation d'un hétérodimère non-covalent. La protéine E2 contient trois régions hypervariables (HVR1, HVR2 et HVR3) (Kato et al., 1992; Troesch et al., 2006) qui sont des points chauds au niveau de la diversité génétique, plus spécifiquement la région HVR1. Ces régions hypervariables peuvent varier jusqu'à 80% au niveau de l'identité des acides aminés qui les composent (Barth et al., 2006), ce en réponse à la pression sélective exercée par le système immunitaire (Pavlovic et al., 2003). E1 et E2 sont aussi essentiels pour la l'entrée virale (ligation au récepteur et infectivité) (Penin et al., 2004).

### **La protéine p7**

p7 est une petite protéine membranaire qui agit comme un canal ionique (Pavlovic et al., 2003). Cette protéine de 63 acides aminés est modifiée par la peptidase signalée de l'hôte, qui clive les séquences de signalisation entre E2, p7, NS2 (Lindenbach et al., 2005), suggérant que l'expression de p7 est régulée (Penin et al., 2004). Il a été démontré que p7 contribue au contrôle de la perméabilité ionique de la membrane (Griffin et al., 2003); c'est pour cette raison qu'elle représente un candidat intéressant pour le développement de traitements antiviraux.



**Figure 1.3 : Organisation des protéines du VHC en relation avec la membrane du réticulum endoplasmique.** Basée sur les schémas provenant de Lindenbach et al., 2005 et de Dustin et Rice 2007.

#### 1.2.4. L'entrée virale et la réplication

Jusqu'à présent, les seuls organismes connus étant capables de supporter la réplication du VHC sont l'humain et le chimpanzé, les cellules cibles étant principalement les hépatocytes. Comme le foie est l'organe qui supporte majoritairement la réplication virale, on a supposé que les récepteurs cellulaires du virus étaient exprimés spécifiquement sur les hépatocytes. Plusieurs candidats potentiels ont été identifiés. On retrouve parmi eux le récepteur de lipoprotéine de faible densité (LDLr) (Agnello et al., 1999), la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998), le scavenger receptor-B1 (SR-B1) (Scarselli et al., 2002), des glycosaminoglycans, les récepteurs DC-SIGN et L-SIGN (Cormier et al., 2004; Lozach et al., 2004) et ASGPr (asialoglycoprotéine) (Saunier et al., 2003). De tous ces candidats, CD81 semble être le plus probable, étant donné qu'il a été démontré que la boucle extracellulaire de la glycoprotéine virale E2 se lie à celui-ci avec une haute affinité (Pileri et al., 1998). SR-B1, un récepteur impliqué dans le transport bidirectionnel du cholestérol, est un autre candidat attrayant puisqu'il a été démontré

qu'en présence de siRNA pour SR-B1 l'entrée des pseudoparticules de VHC est remarquablement diminuée (Lavillette et al., 2005). Des études faites sur ces deux récepteurs ont démontrées que des cellules hépatiques exprimant les molécules CD81 et SR-B1 sont permissives à l'infection avec des pseudoparticules du VHC, mais que des cellules non-hépatiques exprimant CD81 et SR-B1 ne le sont pas (Bartosch et al., 2003a; Cormier et al., 2004). Il est donc proposé que ces récepteurs servent de corécepteurs et que le récepteur primaire soit spécifique aux hépatocytes.

Plus récemment, un récepteur candidat essentiel pour l'entrée cellulaire du VHC a été identifié. Le récepteur en question est la protéine Claudin-1, une composante des jonctions serrées qui est exprimée à des niveaux très élevés dans le foie. Plus spécifiquement, c'est la première boucle extracellulaire de cette protéine (EL1) qui est nécessaire pour permettre l'entrée du VHC dans la cellule (Evans et al., 2007).

En plus d'être impliquées dans l'association avec les récepteurs sur les cellules cibles, les glycoprotéines E1 et E2 du VHC ont une structure homologue aux protéines de fusion des autres flavivirus, suggérant qu'elles sont des protéines de fusion de type II (Rey et al., 1995; Bressanelli et al., 2004). Les protéines de fusion de type II ont un peptide de fusion interne (Voisset et al., 2004) qui est exposé après un changement de conformation induit par une faible baisse de pH (vers un pH acide) dans les endosomes (Hsu et al., 2003). Suite à son exposition, le peptide de fusion catalyse la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Bressanelli et al., 2004). Le génome viral est ensuite relâché dans le cytoplasme de la cellule. L'initiation de la traduction de la polyprotéine survient après la ligation du ribosome à l'IRES.

### 1.2.5. Les protéines non structurales

Les six autres protéines du VHC sont des protéines non-structurales qui forment un complexe de réplication qui est lié à la membrane cellulaire (Gosert et al., 2003). Ce sont NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, et NS5B.

#### NS2

La protéine NS2 est intégrée à la membrane du RE et ne semble pas être nécessaire pour la formation du complexe de réplication *in vitro* (Lohmann et al., 1999), mais qui est par contre nécessaire *in vivo* (Brass et al., 2006). La seule fonction attribuée à NS2 est le rôle d'autoprotéase qu'elle partage avec le terminal aminé de NS3. Les deux-tiers en C terminal de NS2 possède une activité cystéine protéase (Lindenbach et al., 2005).

#### NS3/NS4A

Le complexe NS3/NS4A est une sérine protéase responsable pour tous les événements d'épissage protéolytique qui surviennent en aval de ce site (Lindenbach et al., 2005). NS4A est une petite protéine de 54 acides aminés qui agit en tant que cofacteur pour NS3 en orientant son site catalytique (Huang et al., 2006) et fait aussi en sorte que NS3 soit ciblée aux membranes intracellulaires du RE par un peptide hydrophobe en N-terminal (Wolk et al., 2000).

NS3 est une protéine multifonctionnelle qui contient une séquence codant pour une NTPase/ARN hélicase dans les 2/3 C-terminal (Lindenbach et al., 2005). Son activité d'hélicase est indispensable pour la réplication virale. En bref, elle sépare des régions de 18pb de l'ARN substrat (Serebov et al., 2004; Levin et al., 2005). Par contre la

signification de cette fonction dans le contexte du processus de réplication de l'ARN viral est encore mal comprise.

Étant donné le rôle important de NS3 dans la maturation de la polyprotéine, plusieurs études ont été consacrées au développement de traitements antiviraux qui ciblent spécifiquement cette protéine. Il existe deux classes d'inhibiteurs de protéase qui ont été créés largement par des études de modélisation moléculaire: les inhibiteurs peptidomimétiques (De Francesco et al., 2003) et les molécules non-peptidiques. Parmi les inhibiteurs peptidomimétiques, on retrouve deux sous catégories de molécules: les non-covalents (molécules ayant une plus haute affinité pour le site catalytique de NS3) et les molécules covalentes (qui se lient d'un façon irréversible au résidu sérine dans le site actif ou qui incorporent des groupes qui vont piéger le résidu sérine) (Narjes et al., 2003). Deux molécules peptidomimétiques sont présentement en étude clinique de phase 2, et une autre et en évaluation toxicologique (Tableau 2).

#### **NS4B**

NS4B est une protéine de 27 kDa très hydrophobe qui devient intégrée à la membrane du RE suite à une localisation cotraductionnelle (Hugle et al., 2001). Il a récemment été observé que l'expression de NS4B induit la formation d'une altération spécifique de la membrane, sorte de toile membraneuse qui servirait d'échafaudage pour le complexe de réplication (Egger et al., 2002).

#### **NS5A**

NS5A est un zinc métalloprotéinase qui a une structure ressemblant à une pince (Tellinghuisen et al., 2004) et qui a pour fonction d'influencer l'efficacité de réplication du VHC (Evans et al., 2004; Appel et al., 2005). C'est une protéine qui est phosphorylée

sur plusieurs résidus sérine et qui joue possiblement un rôle dans la modulation de la réponse à l'IFN (Lohmann et al., 2001).

### **NS5B**

NS5B est l'ARN polymérase ARN dépendante du VHC. La protéine est ciblée à la membrane du RE par son domaine transmembranaire de façon post-traductionnelle. La structure de cette protéine prend la forme classique « main droite » des polymérases simple brin (Ollis et al., 1985), c'est-à-dire qu'il y a un doigt, une paume et un pouce encerclant le site catalytique de la polymérase. Cette structure permet la formation d'un canal qui laisse la polymérase s'associer avec l'ARN simple brin (Lesburg et al., 1999). La polymérase produit une chaîne d'ARN simple brin de polarité négative et, par la suite, utilise cet intermédiaire pour produire l'ARN génomique de polarité positive.

NS5B représente une cible intéressante pour le développement d'anti-viraux puisqu'elle joue un rôle essentiel dans le cycle de réplication viral. Dans la catégorie d'inhibiteurs de polymérase, il y a les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques. Les inhibiteurs nucléosidiques de NS5B permettent la terminaison prématurée du processus d'élongation de l'ARN naissant. Parmi les nouveaux candidats il y a le NM283 (Idenix), une pro-drogue administrée de façon orale qui non seulement inhibe directement la polymérase mais qui s'incorpore aussi à la chaîne naissante (Toniutto et al., 2007). La pro-drogue R1626 (Roche) est quant à elle convertie en R1479 *in vivo* qui a été essayé sur des patients chroniques infectés avec le VHC avec des résultats promettant.



Les inhibiteurs non-nucléosidiques, eux, ciblent les sites allostériques régulateurs de NS5B. Deux molécules inhibitrices non-nucléosidiques sont présentement en essai clinique (Tableau 2).

**Tableau 1.2 –Agents anti-VHC en voie de développement**

<b>Drogue</b>	<b>Compagnie</b>	<b>Phase</b>	<b>Catégorie</b>	<b>Référence</b>
<b>ITMN 191</b>	Intermune	Évaluation toxicologique	Inhibiteur NS3 peptidomimétique non-covalent	InterMune, communiqué de presse. 2006-10-30
<b>VX-950</b>	Vertex – Eli Lilly	II	Inhibiteur NS3 peptidomimétique covalent	Narjes et al., 2003
<b>SCH 503034</b>	Schering-Plough	II	Inhibiteur NS3 peptidomimétique covalent	Schering-Plough,, communiqué de presse. 2005-11-14
<b>NM-283</b>	Idenix/Novartis	II	Inhibiteur NS5B nucléosidique	Toniutto et al., 2007
<b>JTK-103</b>	Akros	II	Inhibiteur NS5B allostérique	Huang et al., 2006
<b>HCV-796</b>	Viro/Wyeth	I	Inhibiteur NS5B allostérique	Viropharma, communiqué de presse. 2006-10-24
<b>R1626</b>	Roche	II	Ihibiteur NS5B nucléosidique	Roche, communiqué de presse. 2006-10-27

### 3 – La réponse immunitaire

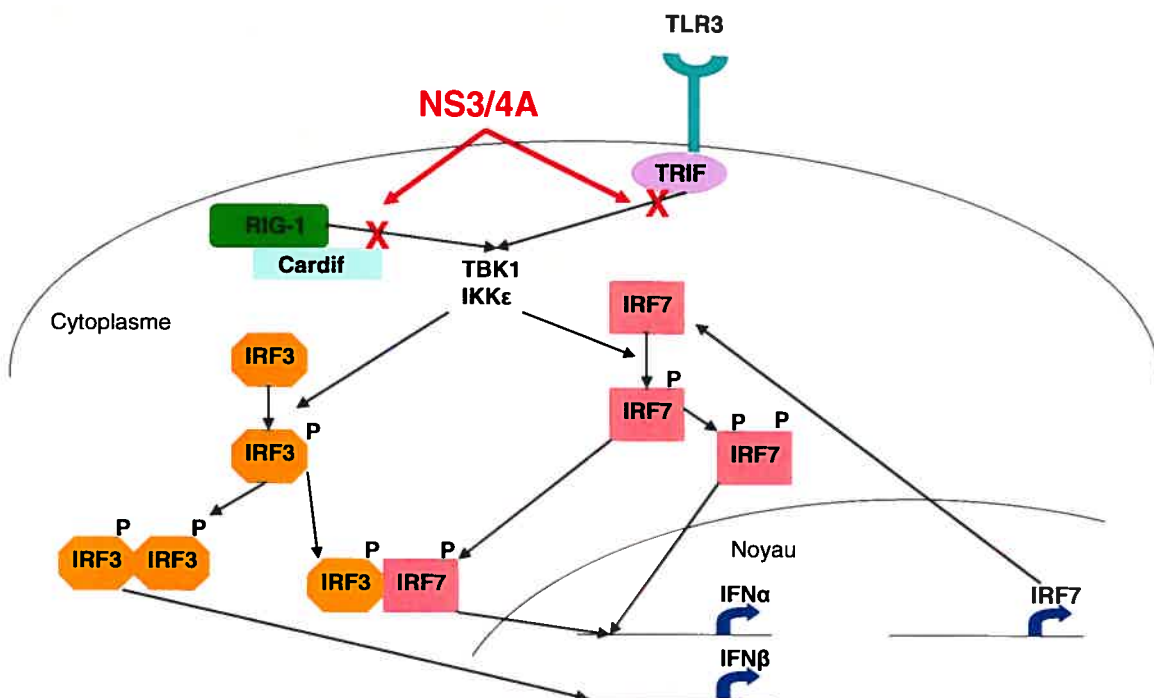
#### 1.3.1. Contexte

La qualité de la réponse immunitaire innée et adaptative qui est produite lors de l'infection par le VHC est un facteur crucial pour déterminer si le virus sera éliminé ou si une infection chronique va s'installer. Puisque la phase aiguë n'est pas apparente pour la majorité des personnes infectées, les données utilisées pour comparer une réponse immunitaire qui réussit à résoudre l'infection *versus* une réponse qui ne réussit pas à contrôler la réplication virale ont été obtenues *via* des modèles d'infection aiguë chez le chimpanzé (Cooper et al., 1999; Bowen et al., 2005) et des cohortes de personnes avec des comportements à haut risque (Lechner et al., 2000; Bowen et al., 2005).

#### 1.3.2. La réponse innée

Le système immunitaire inné utilise de nombreuses stratégies pour détecter la présence de l'ARN viral. Des récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires conservés parmi les pathogènes sont capables de déclencher une cascade biochimique qui produit un environnement cellulaire antimicrobien. Pour la reconnaissance de l'ARN double-brin les molécules Toll-like receptor 3 (TLR3) et RIG-I (Figure 1.4), déclenchent des cascades qui ultimement vont produire des cytokines proinflammatoires (notamment les IFN de type 1). Ceci mène à une augmentation de la production des gènes inductibles par l'IFN de type 1; dont le facteur de transcription STAT1 et les voies activées par les gènes des familles OAS et Mx, gène 56 et NFkB (Bigger et al., 2001). Cette réponse est observée dans tous les cas d'infection aiguë avec le VHC, nonobstant le résultat de l'infection (chronicité vs. résolution) (Bigger et al., 2001; Su et al., 2002). Par contre, chez le

chimpanzé, l'intensité de cette réponse est un prédicteur de l'issue de l'infection (Major et al., 2004).



**Figure 1.4 : Cascades TLR3 et RIG-I et leur implication dans l'immunité innée.** Points d'inhibition de la sérine protéase du VHC NS3/4A. *Adapté du schéma de Qureshi 2006.*

D'autres cellules d'origine lymphoïde qui pourraient avoir une influence sur les étapes précoces de l'infection sont les cellules NK (qui sont abondantes dans le foie), les NKT, et les cellules dendritiques qui servent de liaison entre la réponse innée et la réponse adaptative (Guidotti et al., 2001; Munz et al., 2005).

Le VHC, pour sa part, dispose de plusieurs mécanismes pour interférer avec la réponse innée. La sérine protéase du VHC, NS3/4A est capable de bloquer IRF3 dans la cascade de RIG-I en inhibant la protéine adaptatrice Cardif, ainsi qu'en clivant TRIF, une protéine adaptatrice dans la cascade de TLR3 (Figure 1.4) (Foy et al., 2005; Li et al., 2005).

### 1.3.3. La réponse humorale

Le rôle exact de la réponse humorale dans le contexte d'une infection avec le VHC n'est pas très bien compris. Des anticorps spécifiques au VHC sont détectables seulement de 6 à 8 semaines après l'infection, ce qui représente un délai considérable pour la séroconversion. Les anticorps dirigés contre les protéines non-structurales du virus sont généralement détectés avant ceux dirigés contre les protéines structurales et sont pour la plupart de l'isotype IgG1 (Netski et al., 2005). Ces anticorps ne sont pas indispensables pour la résolution de l'infection (Cooper et al., 1999; Thimme et al., 2002) et, chez les patients qui ont une résolution spontanée de l'infection les titres d'anticorps anti-VHC diminuent rapidement (Takaki et al., 2000). Ils peuvent influencer le cours de la maladie : par exemple, l'apparence des anticorps spécifiques pour la région hypervariable 1 (HVR1) de E2 est associée avec la transition vers une infection chronique (Major et al., 2004). Il existe des anticorps neutralisants, mais ceux-ci ne contribuent pas en grande partie à l'immunité protectrice, puisque des hauts titres peuvent être détectés chez des patients infectés chroniquement (Dustin et Rice 2007).

Il est possible, par contre, que la réponse humorale puisse conférer une protection partielle contre une infection par le VHC. Des études menées chez le chimpanzé ont montré que l'apparition d'anticorps anti-E2 correspondait à une diminution de la charge virale (Youn et al., 2005) et que l'immunisation avec de l'antisérum hyperimmun pouvait réussir à protéger les chimpanzés contre le VHC dans le contexte de challenge autologue. (Farci et al., 1996).

#### 1.3.4. La réponse cellulaire

La réponse aiguë est, en général, définie comme prenant place durant les premiers 6 mois suivant l'infection avec le VHC. Lors des premières semaines, la charge virale plasmatique augmente de façon exponentielle avant que le système immunitaire réussisse à prendre le contrôle (transitoire ou permanent) de la réplication virale. L'induction de l'IFN- $\gamma$  au niveau du foie est détectable seulement quelques semaines suite à l'infection par le VHC chez l'humain. Chez les patients qui réussissent à maintenir un contrôle transitoire de la virémie, on observe une augmentation de l'expression des gènes inductibles par l'IFN- $\gamma$  (MIG, RANTES, IP10) et de ceux associés avec la présentation antigénique (Su et al., 2002). La raison pour laquelle la réponse adaptative peut prendre des semaines avant de faire son apparition n'est pas encore bien comprise (Cooper et al., 1999; Thimme et al., 2001).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle important dans le contrôle de la virémie. Tout dépendant de la nature du pathogène, les cellules T CD4<sup>+</sup> vont se différencier en cellules T-*helper* 1 (Th1) et produire des cytokines (i.e. IFN- $\gamma$ ) qui vont sensibiliser et soutenir une réponse à médiation cellulaire, ou elles vont se différencier en cellules T-*helper* 2 (Th2) et produire des cytokines (i.e. IL-4) qui vont induire une réponse à médiation humorale.

Un atout des virus à ARN (comme le VHC) qui établissent une infection persistante consiste en leur capacité d'induire un état dysfonctionnel des cellules T CD4<sup>+</sup> (Shoukry et al., 2004). Chez les patients qui ont une résolution spontanée de l'infection, la réponse CD4<sup>+</sup> est robuste, cible de nombreux épitopes (Missale et al., 1996; Thimme et al., 2001), et mène à une production d'IFN- $\gamma$  dépendante de l'antigène (Woollard et al.,

2003). Une réponse  $CD4^+$  est détectable, du moins de façon transitoire (Gerlach et al., 1999) chez la majorité des patients. Par contre il faut que cette réponse soit maintenue pour éradiquer le virus (Gerlach et al., 1999).

L'initiation de la réponse immune  $CD8^+$  est associée à une augmentation des niveaux d'ALT et d'AST (aspartate aminotransférase) et une diminution de l'ARN viral en circulation (Thimme et al., 2002). Ces cellules, dite lymphocytes T cytotoxiques (LTC), ont une fonction effectrice et peuvent sécréter les cytokines  $TNF-\alpha$  et  $IFN-\gamma$ . Chez l'humain comme chez le chimpanzé la réponse immune médiée par les cellules  $CD8^+$  qui réussit contrôler l'infection en ciblant plusieurs épitopes restreints par les molécules du CMH de classe I (Rehermann et al., 1996; Cooper et al., 1999; Lechner et al., 2001; Lauer et al., 2004; Urbani et al., 2006).

Chez les patients qui résolvent une infection VHC, des réponses immunes  $CD4^+$  et  $CD8^+$  de type mémoire sont mesurables même plusieurs années après la résolution (Urbani et al., 2006; Kanto et al., 2006). Ceci pourrait expliquer l'incidence diminuée de l'infection chronique observée chez les personnes ayant résolu l'infection en phase aiguë et qui se sont par la suite réexposées au VHC (Mehta et al., 2002).

## **4 - Vaccin**

### **1.4.1. Développement de vaccin**

On estime que près de 3% de la population mondiale est infectée par le VHC. Ceci représente un réservoir énorme pour de nouvelles infections et un problème de santé publique très important. Même si il y a beaucoup de traitements prometteurs pour traiter le VHC à l'horizon, les meilleurs régimes thérapeutiques présentement utilisés n'ont seulement que 50% de succès chez les patients infectés de manière chronique. Il serait très avantageux de développer un vaccin, prophylactique et/ou thérapeutique afin d'améliorer la situation présente.

Le développement d'un vaccin contre le VHC a rencontré beaucoup des mêmes obstacles qui ont limité les résultats de la recherche sur ce virus : la grande diversité génomique et la distribution géographique du VHC, les quasiespèces en évolution continue, et le manque de modèles animaux pour étudier l'infection par le VHC. Le seul modèle animal pour tester les traitements dans un contexte d'infection est le chimpanzé, et chez ceux-ci l'infection se résout plus que chez l'homme. Il y a cependant plusieurs pistes encourageantes en ce qui en trait au développement de vaccin; il est estimé qu'un certain pourcentage (jusqu'à 50% - Seeff LB 2002) des personnes qui deviennent infectées avec le VHC vont réussir à contrôler la virémie au cours de la période aiguë et vont éliminer l'infection. Le système immunitaire peut donc, dans certaines circonstances, contrôler l'infection (voir section précédente). Les réponses immunitaires de ces patients, ainsi que celles des chimpanzés infectés qui éliminent l'infection, ont révélé des éléments importants pour la résolution de l'infection (Lechner et al., 2001). Il a été démontré que les individus qui montent une forte réponse de type

Th1 ciblant plusieurs épitopes viraux, notamment ceux des protéines de la capside (core) et des protéines non-structurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), ont plus de chances de résoudre l'infection (Tsai et al., 1997; Gerlach et al., 1999). On a aussi observé qu'une réponse incluant des cellules CD4<sup>+</sup> Th était nécessaire pour maintenir le contrôle de la virémie. Le rôle des anticorps reste mal compris. Des anticorps neutralisants réagissant contre plusieurs génotypes du VHC ont été observés, anticorps qui reconnaissaient les glycoprotéines E1 et E2 de l'enveloppe (Meunier et al., 2005). L'importance de leur contribution à la réponse immunitaire reste cependant à définir. Puisque le système immunitaire semble être capable de résoudre l'infection dans certaines circonstances, il est possible qu'un vaccin stérilisant ne soit pas nécessaire : un vaccin qui augmenterait le spectre et la spécificité de la réponse immunitaire de l'hôte pourrait suffire. Plusieurs plateformes vaccinales ont été développées dans cette optique. Les sections qui suivent contiennent une brève description de quelques stratégies vaccinales ayant été essayées et de quelques autres qui sont en développement.

#### **1.4.2. Protéine recombinante**

Cette méthode consiste à utiliser une protéine virale produite *in vitro* en conjonction avec un adjuvant pour augmenter son immunogénicité. Puisque l'immunisation avec des protéines de la capside et de l'enveloppe ont un effet protecteur chez d'autres *Flaviviridae* chez l'humain, ce sont majoritairement ces protéines qui ont été utilisées pour le développement de vaccins protéiques dans le cas du VHC. Les glycoprotéines E1 et E2 avec un adjuvant huile/eau ont été utilisées pour immuniser des chimpanzés qui ont, par la suite, été inoculés avec le VHC. Ce vaccin a réussi à stimuler une réponse humorale robuste et a même réussi à protéger les chimpanzés contre un



challenge avec un virus homologue (Choo et al., 1994). Un challenge avec un virus hétérologue par contre a mené à une infection aiguë chez tous les animaux, quoi que l'infection se soit plus fréquemment résolue chez les animaux immunisés (Houghton et Abrignani, 2005; Youn et al., 2005).

Les réponses humorales et cellulaires contre la glycoprotéine E1 sont souvent diminuées chez les patients chroniquement infectés. Un rôle thérapeutique pour cette protéine a donc été évalué en immunisant avec E1 (alum comme adjuvant). Il a été démontré que ce vaccin pouvait améliorer le pronostic de l'hépatite C (Leroux-Roels et al., 2004). Il fait présentement objet d'études clinique de phase II (Innogenetics).

Un vaccin comprenant la polyprotéine (core + protéines non-structurales) a été utilisé dans un modèle murin pour étudier les réponses immunes B et T avec deux adjuvants différents: la poly (DL-lactide co-glycolide) (Otten et al., 2003) et le MF59 (Ott et al., 1995), en présence ou en absence de motifs cytidine-phosphate-guanosine (CpG) (Klinman 2004). Les motifs CpG non méthylés sont utilisés de manière courante dans le développement de vaccins à ADN parce qu'ils augmentent la réponse immunitaire de type 1 en induisant la production d'IL-6, IL-12 de d'IFN- $\gamma$  (Klinman et al., 1996, Chu et al., 1997, Klinman et al., 1997,). Ces formulations de vaccin ont élicité d'importantes réponses humorales et cellulaires dirigées contre la polyprotéine complète ainsi qu'envers les composantes individuelles (Vajdy et al., 2006).

Un autre vaccin en phase Ib d'étude clinique est la protéine core avec l'adjuvant ISCOMATRIX (Polakos et al., 2001). Ce vaccin induit des réponses de type Th1 CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> chez des macaques et des individus sains.

### **1.4.3. Virus-like particles (VLP)**

Ce type de vaccin a l'avantage d'avoir les mêmes propriétés qu'un virion de VHC. Ces particules auto assemblantes sont produites dans des cellules d'insectes à partir de l'ADNc des protéines structurales du VHC (core, E1 et E2). L'immunisation avec le VLP-VHC chez le babouin et la souris a produit de fortes réponses Th1 et des titres d'anticorps anti-E2 élevés (Lechmann et al., 2001; Jeong et al., 2004). L'administration des VLP avec des CpG n'a pas augmenté l'immunité de façon significative dans ces deux études.

Une étude récente a rapporté que des VLP-VHC formées par la protéine de capsid du virus mosaïque de la papaye fusionnée à la glycoprotéine E2, ont produit une réponse immunitaire de type Th1/Th2 chez des souris C3H/HeJ (Denis et al., 2007).

### **1.4.4. Virus recombinants**

Les virus recombinants représentent une méthode efficace d'acheminer de l'ADN aux organes cibles et produire des niveaux de protéine recombinante élevés. Les virus souvent utilisés comme véhicule de livraison de matériel génétique sont les adénovirus et les poxvirus puisqu'ils ont des génomes assez larges et l'innocuité des souches atténuées a déjà été évaluée (Perkus et al., 1995).

Une plateforme vaccinale employant l'adénovirus de type 6 (Ad6) exprimant les protéines non-structurales du VHC a été testée chez la souris et les résultats indiquent que ce vecteur est capable d'induire efficacement des réponses cellulaires et humorales diversifiées contre le VHC (Capone et al., 2006). De plus, il y a moins d'anticorps

neutralisants contre l'Ad6 présents chez la population nord américaine qu'il y en a pour l'Ad5, le vecteur le plus souvent utilisé.

Enfin, Biomérieux a développé une plateforme vaccinale utilisant le *Modified Vaccinia Ankara* (MVA) pour immuniser contre les glycoprotéines E1 et E2 (Abraham et al., 2004). L'utilisation de ce vecteur chez des souris transgéniques pour HLA-A2.1 a produit des réponses Th1, tandis que chez les souris C57Bl/6, c'est une réponse de type Th2 qui a été induite.

#### **1.4.5. Vaccin à ADN**

Un vaccin à ADN consiste en un plasmide purifié contenant un insert codant pour l'antigène contre lequel on veut immuniser. Les vaccins à ADN sont souvent administrés avec des molécules immunomodulatrices (interleukines, facteurs de croissance, motifs bactériens conservés) pour tenter d'augmenter leur immunogénicité et obtenir une réponse Th1 et une réponse Th2. On utilise aussi des stratégies « prime-boost » où le vaccin à ADN est administré avec une immunisation (boost) protéique.

Ainsi, un vaccin à ADN exprimant les protéines core, E1, E2 et NS3 a élicité une immunité protectrice chez le chimpanzé contre une infection avec le VHC hétérologue ou de moins a mené à une amélioration de l'infection (Rollier et al., 2004). Un autre groupe a testé un vaccin à ADN codant pour toutes les protéines du VHC avec un « boost » de poxvirus de canari, les résultats de cette étude indiquent que le « boost » servirait de manière d'augmenter et de diversifier la réponse des cellules T envers les protéines du VHC (Pancholi et al., 2003).

#### 1.4.6. Vaccin Peptidique

Il s'agit d'immuniser contre un antigène en utilisant les épitopes qui vont être directement reconnus par les cellules T  $CD8^+$  ou  $CD4^+$ . Des algorithmes de prédiction permettent d'identifier dans la séquence d'une protéine des motifs qui seront reconnus par les CMH de classe I et de classe II et qui vont, suite à l'immunisation, cibler la réponse immunitaire envers ces épitopes.

Parmi les études faites sur ce type de vaccin, on en retrouve une qui a utilisé des peptides LTC et Th de trois protéines non-structurales du VHC (NS3, NS4B et NS5B). Les peptides ont été utilisés pour immuniser des souris transgéniques pour HLA-A2.1 et les réponses immunitaires subséquentes ont été analysées. On a observé que ces peptides avaient la capacité d'activer de cellules VHC spécifiques produisant de l'IFN- $\gamma$  (Fournillier et al., 2006).

## **5 – L'ARFP/F**

### **1.5.1. Historique**

En 2001, deux équipes ont découvert une nouvelle protéine distincte encodée dans un cadre de lecture alternatif chevauchant celui de la protéine de la nucléocapside. L'équipe de Xu et al. a réussi à produire cette protéine de 17 kDa en introduisant un changement de cadre de lecture programmé pour traduire l'ORF+1 de core (Xu et al., 2001). L'équipe de Walewski s'est basée sur l'hypothèse que plusieurs virus encodent des gènes dans des régions chevauchantes et a lancé comme hypothèse que le VHC pourrait lui aussi avoir de telles régions multifonctionnelles. Ils ont utilisé le programme « Framesplitter » et l'analyse de séquences pour vérifier l'existence de telles séquences. La protéine ainsi découverte a par la suite été nommée ARFP pour « alternate reading frame protein » (Walewski et al., 2001) ou protéine F pour « frameshift » (Xu et al., 2001)

### **1.5.2. Séquençage**

La présence d'un ORF+1 a été détectée dans au moins 89% des séquences de VHC disponibles dans GenBank (Walewski et al. 2001). La conservation de ce cadre de lecture indique qu'il est bénéfique pour la survie du VHC d'une façon ou d'une autre. Il est particulièrement intéressant que l'un des proches parents du VHC, le virus GB (GBV – Deinhardt et al., 1967), encode lui aussi une protéine dans un cadre de lecture alternatif de la protéine core (Xu et al. 2001).

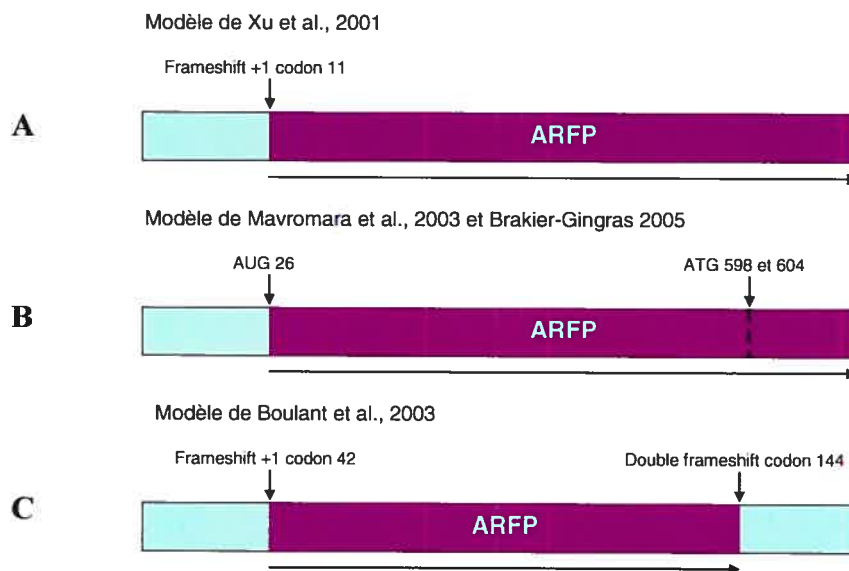
Des analyses de séquence de l'ARFP ont démontré que la séquence d'acides aminés de l'ARFP est plus variable à travers les génotypes du VHC que celle de la protéine core (Ogata et al., 2002), mais qu'elle aurait le même degré de conservation

d'identité que la protéine NS2 (Walewski et al., 2002). En revanche, à l'intérieur d'un génotype, la séquence d'acides aminées de l'ARFP est plutôt conservée, i.e. >90% pour les génotypes 1a et 3, et >60% pour le génotype 2 (Bain et al. 2004). La divergence entre les séquences n'affecte pas la reconnaissance antigénique des anticorps anti-ARFP : pour la grande majorité des génotypes, (1, 1a, 1b, 1c, 2, 3, 4, 5) la reconnaissance anti-ARFP (construction génotype 1a) parmi les isolats de VHC varie entre 42% (génotype 1a) et 77% (génotype 2) (Komurian-Pradel et al. 2004). Il y a donc une réactivité croisée considérable des anticorps anti-ARFP qui pourrait être intéressante pour le développement d'un immunogène.

### **1.5.3. Biologie moléculaire et synthèse**

La protéine en tant que telle possède une masse moléculaire moyenne de 17 kDa, quoi que cela varie tout en fonction du génotype (Ogata et al. 2002; Xu et al. 2003). Elle partage sa séquence N-terminale avec la protéine de la nucléocapside, core, et a une très courte demi-vie (8-10 minutes). Sa stabilité *in vitro* peut être augmentée avec l'ajout d'un inhibiteur de protéasome, tel que le MG132 (Xu et al., 2003; Roussel et al., 2003; Lamarche et al., non publié). Des essais de marquage intracellulaire ont démontré que l'ARFP s'associe avec le réticulum endoplasmique (Xu et al. 2003) et qu'elle se localise au cytoplasme (Roussel et al. 2003).

En ce qui concerne la synthèse de l'ARFP, trois mécanismes alternatifs ont été proposés (Figure 1.5).



**Figure 1.5 : Les trois mécanismes proposés pour la production de l'ARFP.**

Le premier est le mécanisme de changement de cadre de lecture induit par une région riche en adénines (A) entre les codons 8-14 de la séquence codante de la protéine core (Xu et al., 2001; Walewski et al., 2001; Roussel et al., 2003)(Figure 1.5A). Cette séquence, dite « glissante », forcerait un changement de cadre lecture chez une minorité de ribosomes qui initient la traduction au codon initiateur AUG de la protéine core. Ce mécanisme de changement de cadre de lecture programmé serait unique au sein de la famille *Flaviviridae*, mais d'autres virus, tel que l'influenza (Walewski et al., 2001) et les coronavirus (Roussel et al., 2003), partagent la particularité d'encoder des protéines dans des séquences codantes chevauchantes. Certaines controverses demeurent quant aux modalités de ce glissement du ribosome. Le groupe de Wychowski a démontré qu'une mutation aux codons 9 et 11 est absolument nécessaire pour la production de l'ARFP,

tandis que le groupe de Ou a rapporté que ces mutations ne font qu'augmenter la production de l'ARFP. Puisque ces équipes utilisent des approches expérimentales différentes, il est difficile de les réconcilier.

Le deuxième mécanisme proposé est celui d'un codon initiateur interne à la séquence de l'ARFP (Vassilaki et Mavromara 2003; Baril et Brakier-Gingras 2005) (Figure 1.5B). Les résultats qui viennent supporter cette hypothèse sont que des mutations retrouvées dans les séquences provenant des patients infectés contiennent des mutations spontanées dans les codons 9 et 11, mais que cela n'affecte pas la production de l'ARFP. De plus, l'insertion d'un codon stop à la place du codon initiateur ATG de la polyprotéine n'abolissait pas la synthèse de l'ARFP (Vassilaki et Mavromara 2003). Vassilaki et Mavromara ont démontré qu'il y a deux codons ATG additionnels à l'intérieur de la séquence codante pour l'ARFP (598 et 604), qu'ils sont très bien conservés parmi les isolats de VHC, et que si seulement un des deux était muté en GGG cela n'affectait pas la production de l'ARFP. Par contre, si les deux sont mutés en GGG, le niveau de production de l'ARFP diminue considérablement (Vassilaki et Mavromara 2003).

Pour sa part, l'équipe de Baril a montré que le codon 26 (GUG) du cadre de lecture +1 pourrait être responsable de la production de l'ARFP. Ils ont proposé que l'AUG 26 induit un changement de conformation dans le site P de la sous unité 40s du ribosome lorsqu'il interagit simultanément avec l'IRES, ce qui initierait la traduction du cadre de lecture alternatif. Leur argument contre le modèle de changement de cadre de lecture programmé induit par une séquence de glissement, est que ce résultat est favorisé



lorsque la protéine est produite en *E. coli* et que ce n'est probablement pas représentatif de ce qui se passe dans des cellules hépatiques.

De son côté, l'équipe de Jean-Pierre Lavergne a rapporté qu'il y avait initiation au codon 42 dans le cadre de lecture +1 de la protéine core et également au codon 144 (qui produit la protéine « double frameshifted core ») (Figure 1.5C) (Boulant et al., 2003). La critique qui est apportée à ce modèle est que l'AGG présent au codon 42 est relativement rare chez les bactéries, mais que chez les humains c'est plus commun, ce qui pourrait promouvoir un glissement du ribosome chez *E. coli* (Baril et Brakier-Gingras 2005). De plus, le codon Stop présent à la position 144 (UAG) est faible, et pourrait induire un glissement du ribosome au lieu d'un arrêt de la transcription.

Malgré ces divergences d'opinions, il a été confirmé que, peu importe le mécanisme impliqué, l'ARFP est effectivement produite au cours d'une infection naturelle par le VHC (Xu et al., 2001; Walewski et al., 2001; Komurian-Pradel et al., 2004; Troesch et al., 2005)

#### **1.5.4. Fonction biologique**

A ce jour, aucune fonction biologique définitive n'a été attribuée à l'ARFP. Nous savons qu'elle ne partage pas la majorité des fonctions déjà assignées à la protéine core, dont elle chevauche une partie de la séquence codante (Basu et al., 2004). La seule fonction commune de core et de l'ARFP serait une association avec la protéine p21, une kinase inhibitrice cycline-dépendante (Basu et al. 2004). L'expression de l'ARFP diminuerait la quantité de p21, ce qui serait responsable de la promotion de la prolifération cellulaire.

Une interaction spécifique avec la préfoldine 2 (PFD2) lui a été attribuée par méthode de test de levure en double hybride. La surexpression de l'ARFP nuirait à la fonction normale de la préfoldine 2 (PFD2), une sous-unité de préfoldine (PFD) (Tsao et al. 2006). Cette activité de l'ARFP mènerait à des anomalies du cytosquelette et, de ce fait, mettrait fin à la réplication virale. L'ARFP pourrait donc servir de modulateur de réplication virale afin de contourner l'apoptose lors de périodes de réplication élevée, puisque plusieurs protéines du VHC sont cytopathiques dans les hépatocytes (Kalkeri et al., 2001; Balasubramanian et al., 2005). Dans ce sens, l'ARFP aiderait à l'établissement d'une infection persistante. Ces résultats n'ont pas été confirmés d'une manière indépendante.

Il a été établi que l'ARFP n'était pas essentielle pour la réplication du VHC, puisque les séquences des protéines structurales ne sont pas incluses dans les réplicons subgénomiques (Lohmann et al., 1999). Par contre, comme la présence d'un cadre de lecture +1 est hautement conservée parmi les différentes séquences de VHC, l'ARFP pourrait jouer un rôle dans la persistance ou l'infectivité du virus (Brakier-Gingras et Baril 2005; Tsao et al., 2006).

Une étude récente a démontré que l'ARFP pourrait être impliquée dans la production de cytokines proinflammatoires (i.e. IL-6, IL-8, MIP-1 $\beta$ ) qui jouent un rôle dans l'étendue de la pathologie du foie (Fiorucci et al., 2007).

En revanche, une autre étude menée sur le rôle de l'ARFP et du « double frameshifted » (DF) dans le contexte d'une infection par le VHC, a démontré que l'ARFP était non seulement superflue pour la réplication du virus, mais que son absence ne réduisait pas la virémie ou la progression du VHC (McMullan et al., 2007). Par contre

cette étude a adoptée une méthodologie réduisant la complexité de la problématique à un niveau minimum.

#### **1.5.5. Réponses immunitaires spécifiques à l'ARFP**

Les toutes première études démontrant l'existence de l'ARFP ont rapporté que le sérum de patients infectés avec le VHC contient des anticorps reconnaissant spécifiquement cette protéine (Xu et al., 2001; Walewski et al., 2001). Des études subséquentes ont démontré que cette production d'anticorps spécifiques pour l'ARFP était quantifiable chez 62% des patients chroniquement infectés avec le VHC (Komurian-Pradel et al., 2004). En utilisant l'ARFP  $\Delta(1-10)$  (ARFP sans les 10 codons qu'elle partage avec core en N terminal – voir Troesch et al., 2005), il a été démontré que cette réactivité n'était pas croisée avec la protéine core.

En plus des réponses humores contre l'ARFP détectables chez les patients infectés uniquement avec le VHC (Xu et al., 2001; Walewski et al., 2001; Komurian-Pradel et al., 2004; Bain et al., 2004; Troesch et al., 2005), des réponses cellulaires anti-ARFP ont été quantifiées par la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10 (Bain et al., 2004). Les résultats de cette étude démontrent qu'il existe des lymphocytes spécifiques à l'ARFP chez les patients qui sont infectées avec le VHC ou qui ont résolu une infection. De plus, les niveaux de lymphocytes T spécifiques à l'ARFP sont indépendants de la charge virale, du traitement reçu (ou de l'absence de traitement) et du génotype VHC infectant (Bain et al., 2004). En plus d'être généralement moins robuste que la réponse cellulaire dirigée contre core, la réponse cellulaire spécifique à l'ARFP paraît avoir une cinétique différente, apparaissant plus tard que cette dernière (Bain et al., 2004).

Des précurseurs LTC spécifiques à l'ARFP ont été identifiés chez des patients infectés uniquement avec le VHC (fréquence de 81.8%) ainsi que chez des patients coinfectés par le VIH (fréquence de 77.8%), indiquant le potentiel cytotoxique de ces lymphocytes T dans un contexte d'infection naturelle (Troesch et al., 2005). Tout comme les réponses humores, les réponses cellulaires évaluées dans cette étude ne corrèlent pas avec la charge virale (VHC ou VIH dans le cas des patients coinfectés), le statut clinique (traitement, étape de la maladie), le génotype du virus infectant, et, dans le cas des patients coinfectés, le décompte de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Troesch et al., 2005).

Enfin, plusieurs épitopes LTC potentiels ont été identifiés à partir de la séquence complète de l'ARFP (Bain et al., 2004; Troesch et al., 2005), qui pourraient être ciblés spécifiquement par la réponse immunitaire.

Les résultats de ces études indiquent que même si on ne connaît pas la pertinence de la production de l'ARFP dans le contexte de l'infection VHC, la réponse immunitaire spécifique à cette protéine est détectable chez la majorité des patients infectés. En tenant compte du haut degré de conservation de l'ARFP parmi les génotypes et à la prévalence élevée de réactivité croisée, cette protéine représente manifestement une cible très intéressante pour le développement d'un vaccin permettant de prévenir et/ou de guérir l'hépatite C.

## **OBJECTIFS**

1. Évaluer l'immunogénicité de l'ARFP du virus de l'hépatite C chez la souris à l'aide de deux plateformes vaccinales expérimentales, et de là, en dériver les corrélats de protection.
2. Cartographier les épitopes HLA-A2 restreints minimaux de l'ARFP.

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

## **2.1. Souris**

Quatre groupes de 30 souris femelles C57Bl/6 âgées de 5-6 semaines, provenant des laboratoires Charles River, ont été utilisées pour le protocole d'immunisation avec l'ARFP. Pour le protocole d'immunisation avec le vecteur à ADN, nous nous sommes servis de la souche de souris DBA/2 transgénique pour HLA-A\*0201/HLA-DR1 (Pajot et al., 2004). Des colonies mixtes (males et femelles) ont été utilisées pour les premiers deux protocoles avec le vaccin à ADN, alors que seules des souris femelles ont été utilisées pour le troisième protocole.

## **2.2. Production de l'ARFP recombinante**

La protéine a été produite à partir de cultures congelées de la souche bactérienne BL21(DE3)pLys, transformée avec le vecteur pET-30B contenant l'insert codant pour la protéine Fmut8Δ11 (Troesch et al. 2005). Une colonie a été piquée de la culture congelée et mise dans 25 ml de milieu LB avec 25 µl de sulfate de kanamycine (ajusté à une concentration de 30 mg/ml) et placé à 37°C avec agitation pour huit heures. Par la suite, des aliquots de 5 ml de la culture bactérienne ont été transférés dans des flacons contenant 500 ml de milieu LB et 500 µl de sulfate de kanamycine et placés à 37°C avec agitation pour 2h30. Une fois que la densité optique a atteint une valeur de 0.4 à 0.1 (lecture à 595 nm), 600 µl d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), ajusté à une concentration de 200 mg/ml, ont été ajoutés à chacun des flacons, qui ont été remis à 37°C pour un autre 2h30. Le contenu des flacons a été transféré dans des tubes de centrifugation de 250 ml et a ensuite été centrifugé à 4000 x g et température ambiante pour 30 minutes. Le surnageant a été jeté et le culot a été conservé à -20 °C jusqu'à la purification. Le mélange principal pour les tampons de purification consiste en 8 M



d'urée, 0.1 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et 0.01 M de Tris. À partir du mélange principal, le tampon de lyse (Tampon B), est ajusté à un pH de 8.0. Les deux tampons de lavage (Tampons C et D) ont été ajustés à un pH de 6.3 et 5.9 respectivement. Le buffer d'élution (Tampon E) a été ajusté à un pH de 4.5. Une colonne de purification a été préparée en utilisant une seringue de 60 ml remplie de laine de verre stérile.

Les culots bactériens de la veille ont été mis à température pièce et 200 ml du Tampon B ont été rajoutés à un des tubes de centrifugation. Les culots bactériens ont ensuite été combinés et 10 ml de résine His-bind (Novagen) ont été rajoutés au mélange. Le tout a été laissé à température pièce pour 1 heure avec agitation. La suspension a été versée sur la colonne et l'éluat a été récupéré dans des tubes de 50 ml (BD Falcon, Mississauga, Ontario, Canada). Après que tout le liquide soit décanté, 80 ml du Tampon C ont été rajouté à la colonne et le liquide récupéré dans deux tubes de 50 ml. Deux aliquots de 20 ml du Tampon D ont ensuite été rajoutés à la colonne et récupérés dans deux tubes de 50 ml. Finalement, dix aliquots de 20 ml du Tampon E ont été rajoutés à la colonne, chacun capté dans un tube de 50 ml différent. Un échantillon de 1 ml de chacun des tubes de 50 ml a été prélevé pour l'analyse par électrophorèse.

Les fractions éluées ont été concentrées dans des tubes Amicon Ultra 15 (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland) et centrifuger à  $4000 \times g$  pour 20 minutes. Les fractions de protéine concentrée ont été analysées par immunobuvardage et quantifiées par la méthode de Bradford en utilisant une courbe standard faite avec des concentrations connues de BSA (bovine serum albumin).

Lors de la troisième répétition du protocole d'immunisation avec l'ARFP une étape supplémentaire a été utilisée pour purifier la protéine des endotoxines bactériennes.

Les protéines concentrées ont été appliquées sur une colonne contenant l'antibiotique polymyxine B (Détoxigel – Pierce). Les tampons de purification et d'extraction (urée 8M) n'étant pas compatible avec la matrice, des agrégats de protéine se sont formés dans la solution protéine purifiée. Pour cette raison, la quatrième purification a été faite en rajoutant du Triton X114 au tampon de lavage C (Reichelt P. et al., 2006).

### **2.3. Immunobuvardage**

Les échantillons ont été préparés en rajoutant une quantité appropriée de tampon de chargement 6X et en les réchauffant dans l'eau bouillante pour 5 minutes. Un gel de 12% de polyacrylamide (running) et un gel de 4% (stacking) ont été préparés pour l'essai. Les échantillons ont été placés dans les puits et le tampon d'électrophorèse a été rajouté à la cuve. Les échantillons ont migrés pour 2h30 à 82 mA. Le transfert c'est fait sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) pour 1h40 (Vmax et Amax). Les bandes et le front de migration ont été identifiés avec du rouge Ponceau et la membrane a été bloquée avec du TBST 1X + lait 5% pour 2 heures à température pièce. Pour l'identification de protéine l'antisérum de lapin (Troesch et al., 2005) a été dilué à 1/500 dans du TBST 1X + lait 1% et a été incubé avec la membrane pour 12h à 4°C. Pour l'anticorps monoclonal anti-ARFP (Fiorucci et al., 2007), la dilution était de 1/5000 et l'incubation avec la membrane était seulement de 1h à température pièce. La membrane a ensuite été lavée deux fois pour 5 minutes et une fois 15 minutes avec du TBST 1X à température pièce. L'anticorps secondaire (Chèvre anti-lapin IgG-HRP ou Chèvre anti-souris IgG-HRP, Biosys, Compiègne, France) a été diluée dans du TBST 1X + lait 1% à une concentration de 1/10, 000 et a été incubé avec la membrane pour 1h à température ambiante. La membrane a été lavée deux fois pour 5 minutes et

une fois 15 minutes avec du TBST 1X et la solution de chemiluminescence (Roche, Mannheim, Allemagne), préparée selon les directives du fabricant, a été rajoutée à la membrane. Les membranes ont été exposées sur des films Kodak Biofilm (GE Healthcare) à l'obscurité. Dans tous les cas, le contrôle positif pour l'essai était une fraction de protéine préparée au laboratoire dont la séquence a été vérifiée par HPLC (Troesch et al., 2005).

#### **2.4. Transfection des cellules avec vecteur ADN**

Des cellules HEK293 (cellules épithéliales humaines) ont été utilisées pour vérifier l'expression de l'ARFP par le vecteur pMASIA-F. Les cellules ont été maintenues dans du DMEM supplémenté de 10% sérum de veau fœtal (SVF; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) HEPES et des antibiotiques. Des lamelles de verre stériles ont été placées dans les puits d'une plaque de culture cellulaire à 12 puits (BD Falcon) et rincées avec du DMEM. Les cellules ont été mises dans les puits à une concentration de 200 000 à 400 000 cellules par puits et elles ont été incubées pour 12-24h (ou jusqu'à ce qu'elles aient adhéré à la plaque). Le réactif de transfection Fugene (Roche) a été mis dans un tube eppendorf contenant du DMEM et incubé pour 15 min à température pièce. L'ADN a été rajouté au mélange pour que le ratio Fugene : ADN soit de 3:1. 50 µl du mélange ont été ajoutés aux puits appropriés. Les plaques ont été incubées pour 48-72h ou jusqu'à ce que les lamelles soient recouvertes à plus de 50% par les cellules.

#### **2.5. Infection des cellules avec vvARFP pour immunofluorescence.**

Les cellules CV1 (fibroblastes provenant de rein de singe) ont été utilisées pour vérifier l'expression de l'ARFP lors d'une infection avec vvARFP. Comme pour la transfection, les cellules CV1 ont été cultivées sur des lamelles dans des plaques de

culture cellulaire de 12 puits. Lorsque les cellules ont atteint une confluence d'environ 75%, le milieu a été aspiré et elles ont été infectées avec 100  $\mu$ l de vvARFP à une concentration de  $10^6$  pfu/ml. Les plaques ont été incubées à 37 °C pour 30 min et ensuite 1 ml de DMEM-10% SVF a été rajouté aux puits. Les plaques ont été incubées à 37 °C pour 8h.

## **2.6. Immunofluorescence indirecte**

Avant le début de l'essai, l'inhibiteur de protéasome MG132 (Sigma, Saint-Louis, MO, É-U) a été rajouté aux puits appropriés à une concentration de 1  $\mu$ g/ml et les plaques ont été remises à 37 °C pour deux heures. Le milieu a été aspiré des puits et les lamelles ont été lavées 3 x 5 min avec 500  $\mu$ l de PBS-MC (1 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM  $CaCl_2$ ). Les cellules ont ensuite été fixées avec du méthanol froid (-20 °C) et incubées à -20 °C pour 10 min. Les lamelles ont été lavées avec du PBS-MC pour 3 x 5 min. Du  $NH_4Cl$  50mM/PBS 1X a été rajouté aux puits pour l'étape de « quenching ». Une fois de plus, les lamelles ont été lavées avec du PBS-MC pour 3 x 5 min. Les cellules ont été perméabilisées avec du triton 0.2% pour 10 min à température ambiante. Les lamelles ont été lavées avec du PBS-MC pour 3 x 5 min. Du BSA 3%/PBS 1X a été rajouté aux puits pour bloquer pendant 30 min. L'anticorps primaire a été dilué dans de la BSA 3%/PBS 1X pour atteindre une concentration de 1/100. Le temps d'incubation varie pour chaque anticorps; pour le monoclonal (anti-ARFP –Fiorucci et al., 2007) le temps recommandé est de 30 min, alors que pour les autres il est de 2h. Suivant l'incubation avec l'anticorps primaire, les lamelles ont été lavées dans de la BSA 3%/PBS 1X à température pièce pour 3 x 5 min. L'anticorps secondaire anti-IgG souris (Alexa Fluor 488; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) a été dilué dans de la BSA 3%/PBS 1X à une concentration

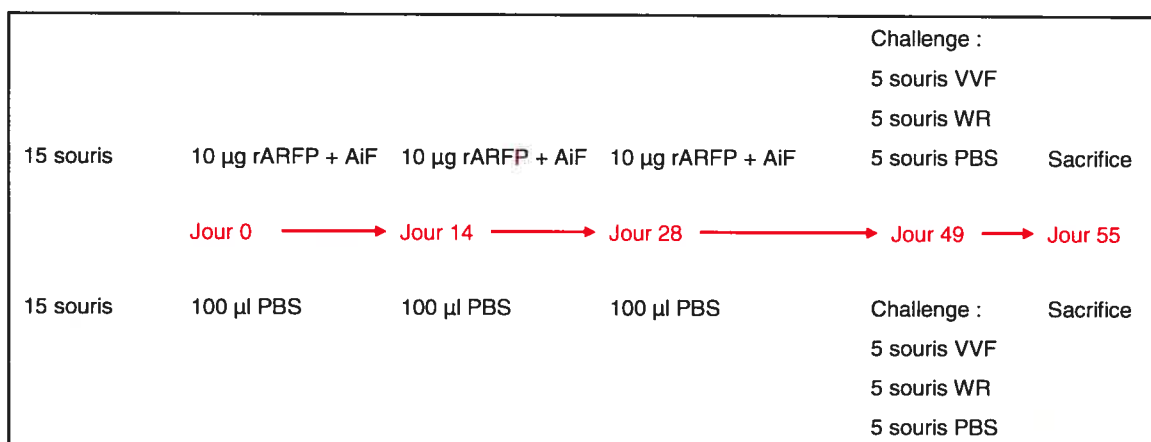
de 1/400 et incubé pour 1h à température pièce. Les lamelles ont été lavées avec de la BSA 3%/PBS 1X pour 3 x 5 min et ensuite avec du PBS 1X pour 3 x 5 min. Les lamelles ont ensuite été placées sur une goutte de VectaShield (Vecta Laboratories, Barlingame, Californie, É-U) sur des lames de microscope, le côté cellulaire vers le bas. Les lamelles ont été visualisées avec un microscope confocal à fluorescence (Nikon eclipse E600, Mississauga, Ontario + Axiocam, Carl Zeiss, Toronto, Ontario, programme Axiocam Vision 3.0).

## **2.7. Immunisations – Vaccin protéique**

Pour les protocoles d'immunisation avec la protéine recombinante, quatre groupes de 30 souris ont été utilisées (Tableau 2.1). Dans chaque groupe de 30, 15 ont été immunisées par la voie sous-cutanée avec 10µg de rARFP diluée dans du PBS (Sigma) (volume total de 50µl en plus de 50µl d'adjuvant incomplet de Freund (AiF)). Les 15 autres ont été immunisées avec 100 µl de PBS. Pour tous les protocoles, les immunisations ont eu lieu à des intervalles de deux semaines pour un total de trois immunisations. Des prélèvements sanguins ont été faits avant chaque immunisation (veine maxillaire et ainsi que par ponction cardiaque en post-mortem). Trois semaines suivant leur dernière immunisation, les souris ont été infectées avec un virus *vaccinia*; dans chaque groupe de 15 souris, 5 souris ont reçu un challenge avec le virus de la vaccine recombinant pour l'ARFP (vvARFP ou VVF), 5 souris ont reçu un challenge avec le virus de la vaccine de type sauvage (vvWR ou WR) et 5 souris ont reçu un challenge avec du PBS (Figure 2.1). Lors des premiers deux protocoles, une dose virale de  $10^7$  pfu a été administrée par voie intravaginale. Mais puisque ceci ne résultait pas en une infection détectable chez les souris, deux protocoles d'optimisation ont été élaborés.

Les résultats de ces deux protocoles ont démontrés que la dose de virus qui devrait être administrée pour obtenir 100% d'infection est de  $2.5 \times 10^7$  pfu/souris, et ce *via* la voie intrapéritonéale. Six jours suivant le challenge avec le virus de la vaccine, les souris ont été sacrifiées par asphyxie par le CO<sub>2</sub>, et le dernier prélèvement sanguin a été fait par ponction cardiaque. Les ovaires (Buller et al., 1985) et les rates de chaque souris ont ensuite été récoltés pour des essais analytiques (test de plaques, qPCR et ELIspot).

**Figure 2.1 : Organigramme des protocoles d'immunisation du vaccin protéique**



**Tableau 2.1 : Protocoles d'immunisation vaccin protéique**

Souris C57Bl/6 femelles âgées de 5-6 semaines

<b>Protocole</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Immunisations</b> (total de 3 à des intervalles de 2 semaines)	15 souris – 10 µg + AiF 15 souris – 100 µl de PBS	15 souris – 10 µg + AiF 15 souris – 100 µl de PBS	15 souris – 10 µg + AiF 15 souris – 100 µl de PBS	15 souris – 10 µg + AiF 15 souris – 50 µl de PBS + 50 µl AiF
<b>Challenge</b> (trois semaines après dernière immunisation)	5 souris vvARFP : 10 <sup>7</sup> pfu 5 souris vvWR : 10 <sup>7</sup> pfu 5 souris : 100 µl PBS  Challenge intravaginale	5 souris vvARFP : 10 <sup>7</sup> pfu 5 souris vvWR : 10 <sup>7</sup> pfu 5 souris : 100 µl PBS  Challenge intravaginale	5 souris vvARFP : 2.5 x10 <sup>7</sup> pfu 5 souris vvWR : 2.5x10 <sup>7</sup> pfu 5 souris : 100 µl PBS  Challenge intrapéritonéale	5 souris vvARFP : 2.5 x10 <sup>7</sup> pfu 5 souris vvWR : 2.5x10 <sup>7</sup> pfu 5 souris : 100 µl PBS  Challenge intrapéritonéale

**2.8. Immunisations – Vaccin à ADN**

Les immunisations pour le vaccin ADN ont été faites en collaboration avec l'équipe du Dr. Qiang Liu au Vaccine and Infectious Disease Organisation (VIDO, Saskatoon, Saskatchewan). Trois protocoles d'immunisation ont été complétés :

A) quatre groupes de 5 souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201 et HLA-DR1 (un vecteur à ADN par groupe) ont été immunisées trois fois à des intervalles de trois semaines avec 50 µg du vecteur approprié (pMASIA-F, pBISIA24-F, pBISIA40-F, pBISIA-tPAS-F) dans 10% Emulsigen et 10 µg de CpG ODN 1826. Des prélèvements sanguins ont été pris à tous les deux semaines ainsi que lors des immunisations. Les souris ont été sacrifiées trois semaines suivant leurs dernières immunisations et les rates

récoltés. Un dernier prélèvement sanguin a été fait en post-mortem pour analyser le titre d'anticorps par ELISA (Tableau 2.2).

B) quatre groupes de 5 souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201 et HLA-DR1 ont été utilisées. Le premier groupe a reçu trois immunisations avec 50 µg du vecteur pMASIA-F. Le deuxième groupe a reçu trois immunisations avec 50 µg du vecteur pMASIA-F ainsi qu'un « boost » à la dernière immunisation avec 5 µg de rARFP recombinante dans du PBS avec 10% Emulsigen et 10 µg de CpG ODN 1826. Le troisième groupe a reçu trois immunisations avec 5 µg d'ARFP dans du PBS et 10% Emulsigen (Tableau 2.3). Le dernier groupe a été immunisé avec du PBS (contrôles). Les périodes des immunisations était le même que lors du premier protocole.

C) quatre groupes de 8 souris femelles DBA/2 transgéniques pour HLA-A2 et HLA-DR1 ont été utilisées. Le premier groupe a reçu trois immunisations avec 10 µg de rARFP dans du PBS avec 10 % Emulsigen et 10 µg de CpG ODN 1826. Le deuxième groupe a reçu trois immunisations avec 50 µg du vecteur pMASIA-F. Le troisième groupe a reçu trois immunisations avec 50 µg du vecteur pMASIA-F ainsi qu'un « boost » à la dernière immunisation avec 10 µg de rARFP dans du PBS avec 10% Emulsigen et 10 µg de CpG ODN 1826 (Tableau 2.4). L'agenda des immunisations était le même que lors des deux protocoles précédents, avec l'exception que trois semaines suivant la dernière immunisation, les souris ont reçu un challenge avec  $10^7$  pfu de *vaccinia* recombinant pour l'ARFP. Cinq jours après le challenge *vaccinia*, les souris ont été sacrifiées et un dernier prélèvement sanguin a été fait. Les ovaires et les rates ont aussi été récoltés.



**Tableau 2.2 : Protocole d'immunisation 5 – vaccin à ADN**

Souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201 et HLA-DR1

<b>Groupe (4 souris)</b>	<b>Immunisation 1 Jour 0</b>	<b>Immunisation 2 Jour 21</b>	<b>Immunisation 3 Jour 42</b>
<b>pMASIA-F</b>	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826
<b>pBISIA24-F</b>	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826
<b>pBISIA40-F</b>	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826
<b>pBISIA-tPAS-F</b>	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	50µg/40µl PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826
<b>PBS</b>	40µl PBS	40µl PBS	40µl PBS

**Tableau 2.3 : Protocole d'immunisation 6 – vaccin à ADN**

Souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201 et HLA-DR1

<b>Groupe (4 souris)</b>	<b>Immunisation 1 Jour 0</b>	<b>Immunisation 2 Jour 21</b>	<b>Immunisation 3 Jour 42</b>
<b>pMASIA-F</b>	50µg/40µl PBS	50µg/40µl PBS	50µg/40µl PBS
<b>pMASIA-F + boost</b>	50µg pMASIA-F/40µl PBS	50µg pMASIA-F/40µl PBS	50µg pMASIA-F/40µl PBS + 5µg rARFP dans PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826
<b>rARFP</b>	5µg dans PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	5µg dans PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	5µg dans PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826
<b>PBS</b>	40µl PBS	40µl PBS	40µl PBS

**Tableau 2.4 : Protocole d'immunisation 7 – vaccin à ADN**

Souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201 et HLA-DR1

<b>Groupe (4 souris)</b>	<b>Immunisation 1 – Jour 0</b>	<b>Immunisation 2 – Jour 21</b>	<b>Immunisation 3 – Jour 42</b>	<b>Challenge Jour 63</b>
<b>p-MASIA-F</b>	50µg/40µl PBS	50µg/40µl PBS	50µg/40µl PBS	4 souris vvARFP : $10^7$ pfu 4 souris vvWR : $10^7$ pfu
<b>p-MASIA-F + boost rARFP</b>	50µg pMASIA-F/40µl PBS	50µg pMASIA-F/40µl PBS	50µg/40µl PBS + 10µg rARFP dans PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	4 souris vvARFP : $10^7$ pfu 4 souris vvWR : $10^7$ pfu
<b>rARFP</b>	10µg dans PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	10µg dans PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	10µg dans PBS 10% Emulsigen + 10µg CpG ODN 1826	4 souris vvARFP : $10^7$ pfu 4 souris vvWR : $10^7$ pfu
<b>PBS</b>	40µl PBS	40µl PBS	40µl PBS	4 souris vvARFP : $10^7$ pfu 4 souris vvWR : $10^7$ pfu

**2.9. Test de plaques**

Des cellules CV1, susceptibles à l'infection par le virus de la vaccine, ont été utilisées pour le test de plaques. Les cellules ont été maintenues dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF; Gibco-Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), de l'HEPES (Gibco-Invitrogen) et des antibiotiques.

Les ovaires récoltés des souris ont été broyés avec un pilon stérile (Eppendorf, Mississauga, Ontario, Canada) dans 200 µl de PBS (Gibco-Invitrogen). Des dilutions en

série ( $10^1$ - $10^8$ ) de chaque lysat d'ovaires ont été faites dans du Opti-MEM (MEM; Gibco-Invitrogen, SVF 2%, HEPES, antibiotiques).

Les cellules CV1 ont été placées dans des plaques de culture cellulaire à six puits (BD Falcon). Après confluence, le milieu a été aspiré des puits et 300  $\mu$ l des dilutions en séries de chacun des lysats ont été mis dans les puits en duplicata. Les cellules ont été incubées pour 30 min à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. 2 ml de milieu DMEM-10% SVF ont ensuite été rajoutés aux puits et les plaques ont été incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 40h. Les cellules ont été fixées avec 50% éthanol et du bleu de méthylène 1% pour 10 min et les plaques ont été rincées avec de l'eau. Les plaques ont été photographiées à l'aide d'un Alpha Imager (Alpha Innotech, San Leandro, Californie, É-U). Les plages de lyses ont été comptées et une moyenne prise pour chaque dilution. La charge virale totale de chaque souris a été calculée à l'aide des formules suivantes : pfu/ml dans dilution = (plages de lyse x 1000) / 300 et pfu/ml dans stock = pfu/ml dans dilution x facteur de dilution.

## 2.10. ELISA

Pour la quantification des IgG totaux, des plaques 96 puits à haute affinité (Greiner Bio-One, Monroe, Caroline du Nord, É-U) ont été incubées avec 1  $\mu$ g/puits de rARFP dans 0.1 M de NaHCO<sub>3</sub> (pH8.6) pendant 12h à 4 °C. Après avoir vidé les puits, les plaques ont été incubées avec 5 mg/ml de BSA dans 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pour 2h à 4 °C. Les plaques ont ensuite été lavées six fois avec du TBST 1X, en les essuyant entre chaque lavage. 200  $\mu$ l de TBST 1X + 5mg/ml BSA ont été rajoutés à la première rangée de chaque plaque et 100  $\mu$ l aux six rangées subséquentes. 4  $\mu$ l de sérum prélevé sur les souris ont été placés dans le premier puits de chaque colonne. Des dilutions en série ont

été faites en transférant 100 µl du premier puits au suivant, et ainsi de suite jusqu'au dernier puits de la colonne. Les plaques ont été incubées pour 2h à température pièce avec agitation. Les plaques ont été lavées six fois avec du TBST 1X, en essuyant entre chaque lavage. L'anticorps secondaire (chèvre anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline; Sigma, Saint-Louis, MO, ÉU) a été dilué à une concentration de 1/10,000 dans du TBST 1X + 5 mg/ml de BSA, et 100 µl ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été incubées pour 1h à température pièce pour ensuite être lavées comme précédemment. 100 µl de la solution de révélation ( $\text{NaCO}_3$  pH 9.8 0.05M,  $\text{MgCl}_2$  0.001M, p-nitrophénylphosphate 1mg/ml; Sigma) ont été rajoutés par puits et les plaques ont été recouvertes avec du papier d'aluminium pour 30 min. La densité optique a été lue à 405nm à l'aide d'un spectrophotomètre MR7000 (Dynatec, Chantilly, Virginie, É-U). Le seuil de positivité a été calculé en prenant la valeur de densité optique la plus élevée parmi les contrôles négatifs et le multipliant par trois.

Pour l'isotypage des anticorps, des plaques 96 puits à haute affinité (Ultident) ont été incubées avec 1 µg/ml de rARFP dans du 0.015M  $\text{NaHCO}_3$  + 0.035M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9.6 pendant 12h à 4 °C. Les plaques ont été lavées cinq fois avec du PBST 1X, en essuyant entre chaque lavage. 495 µl du tampon de dilution (95 ml PBST + 5 ml 10% gélatine) ont été placés dans la première rangée de chaque plaque et 375 µl dans les trois rangées suivantes. Au premier puits de chaque colonne, 5 µl de sérum du dernier échantillonnage ont été rajoutés. 125 µl ont ensuite été transférés au prochain puits, et ainsi de suite jusqu'au quatrième puits. Les plaques ont été incubées 2h à température pièce avec agitation. Les plaques ont été lavées cinq fois avec du PBST 1X et l'anticorps secondaire biotinylé a été rajouté aux puits à une concentration de 1/10 000 (Chèvre anti-souris IgG,

IgG1, IgG2; Caltag Laboratories – Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) et incubé pour 1h à température ambiante. Les plaques ont ensuite été lavées avec du PBST 1X six fois et 100 µl de phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine (Jackson) ajustée à une concentration de 1/5000 avec du tampon de dilution ont été rajoutés aux puits et suite à une incubation de 1h à température pièce, les plaques ont été lavées huit fois avec de l'eau et 100 µl de solution de révélation (voir ci-dessus) ont été mis dans chaque puits. La lecture des plaques s'est faite à 405nm. Le seuil de positivité a été calculé en prenant la moyenne des densités optiques des premiers échantillonnages (sérum pré-immun) plus deux fois l'écart type.

## **2.1. Isolation des splénocytes**

Les rates prélevées sur les souris ont été broyées avec des ciseaux et un piston de seringue dans une plaque de pétri contenant 3 ml de RPMI (Gibco-Invitrogen) supplémenté avec 10% SVF. Les splénocytes ont été isolées de la suspension cellulaire en utilisant un gradient de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Mississauga, Canada). Les cellules isolées ont été resuspendues dans du milieu de congélation (FBS + 10% DMSO) et préservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Lors des protocoles 4-7 (Tableaux 2.2-2.4)) l'isolation des splénocytes a été faite en broyant les rates sur un tamis cellulaire (BD Falcon, Mississauga, Canada) dans une boîte de pétri contenant 10 ml de milieu AIM-V (Gibco-Invitrogen) complet (500 ml AIM-V, 5 ml HEPES 1M, 5 ml acides aminées non-essentiels (Sigma), 0.5 ml 50 mM β mercapthoéthanol). Suite à une centrifugation de 10 minutes à 1200 rpm, 1 ml de tampon de lyse de globules rouges au chlorure d'ammonium a été rajouté au culot cellulaire et incubé pour une minute. Après lavage avec du milieu AIM-V complet, les cellules ont été

resuspendues dans du milieu AIM-V ou du milieu de congélation (SVF + 10% DMSO) si elles n'étaient pas utilisées tout de suite.

## 2.12. ELISpot

Les anticorps de capture (anti IL-4 BD et anti-IFN- $\gamma$ ; BD Biosciences, ville, état) ont été dilués à une concentration de 1/800 dans du 0.015M NaHCO<sub>3</sub> + 0.035M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.6 et rajoutés à des plaques HTS-PVDF (Millipore, Mississauga, Ontario) activées avec éthanol 35% et incubés pour 12h à 4 °C. Les plaques ont ensuite été lavées quatre fois avec du PBS stérile et 100  $\mu$ l de milieu (RPMI-10% ou du AIM-V complet) ont été rajoutés aux puits, suivi d'une incubation de 1h à 37°C. Les cellules isolées des rates des souris ont été comptées et leur concentration ajustée avec du milieu pour obtenir  $5 \times 10^5$  –  $1.0 \times 10^6$  cellules par puits. Une fois l'heure d'incubation écoulée, le milieu a été vidé et 100  $\mu$ l de cellules ont été rajouté aux plaques. Pour chaque souris, 100  $\mu$ l de milieu ont été rajouté à la moitié des puits, et dans l'autre moitié 100  $\mu$ l de rARFP ajustée à une concentration de 2  $\mu$ g/ml dans du milieu (AIM-V complet ou RPMI) ont été rajoutés à l'autre moitié. Le contrôle positif dans tous les cas était la concanavaline A (1  $\mu$ g/ml; Sigma) dilué dans le milieu approprié. Les plaques ont été incubées pour 24 à 48h à 37 °C, et les plaques ont été lavées cinq fois avec du PBST 1X. Les anticorps biotinylés (IL-4 et IFN $\gamma$ ; BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) ont été dilués dans du PBST 1X à une concentration de 1/400 et 100  $\mu$ l ont été rajoutés aux puits des plaques appropriées. Après 3h d'incubation à 37 °C, les plaques ont été lavées cinq fois avec du PBST 1X et 100  $\mu$ l de streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline (1/5000 dans du PBST 1X) ont été rajoutés aux puits. Suite à 90 min d'incubation à température pièce, les plaques ont été lavées huit fois avec de l'eau et la solution NBT BCIP (1 pastille dans

10 ml d'eau – Sigma) a été rajoutée aux puits. Après l'apparition des spots, les plaques ont été lavées avec de l'eau. Les spots ont été comptés à l'aide d'un microscope inversé. Le seuil de positivité est calculé en additionnant la moyenne des spots des cellules des souris PBS stimulées avec le milieu seul et deux fois l'écart type. Les résultats ont été analysés avec un test de variance non paramétrique (Kruskal-Wallis) ainsi que le Mann-Whitney U test utilisant les résultats des souris PBS comme valeur de référence.

### **2.13. Proliférations des splénocytes**

Les splénocytes isolées des protocoles 5-7 ont été mises en plaques 96 puits (Nalge Nunc) à une concentration de  $3.5 \times 10^6$  cellules par puits en triplicata, en présence et en absence (milieu AIM-V seul) de  $2\mu\text{g/ml}$  de rARFP. Les plaques ont été incubées à  $37^\circ\text{C}$  et 5%  $\text{CO}_2$  pour 72h. Pour les protocoles 5 et 6, un test de prolifération en présence du réactif MTT a été fait. Après la période d'incubation  $16\mu\text{l}$  du réactif MTT (5 mg/ml, Promega) ont été rajoutés à chaque puits. Les plaques ont été incubés à  $37^\circ\text{C}$  et 5%  $\text{CO}_2$  pour 3h. À la fin de la période d'incubation les plaques ont été centrifugées à  $1400 \times g$  pour 10 minutes, et  $100\mu\text{l}$  d'isopropanol acidifié ont été rajoutés aux puits. La densité optique a été lue à 595 nm.

Pour le protocole 7, le test de prolifération a été fait avec de la thymidine tritiée (Amersham Pharmacia Biotech). Les splénocytes ont été mises en plaques comme décrits dans la section précédente et incubées pour 72h à  $37^\circ\text{C}$  et 5%  $\text{CO}_2$ .  $20\mu\text{l}$  par puits de thymidine tritiée ( $0.4\mu\text{Ci/puits}$ ) ont été rajoutés aux plaques. Les plaques ont été incubées à  $37^\circ\text{C}$  et 5%  $\text{CO}_2$  pour 18 heures et, par la suite, la radioactivité a été déterminée en utilisant le comptage des scintillations (TopCount NXT Microplate Scintillation & Luminescence Counters; Packard Instrument Company). Les résultats ont



été présentés en index de stimulation (IS), qui a été calculé en prenant la moyenne des comptes par minute (incorporation de thymidine tritiée) pour les cellules traitées avec un antigène (rARFP, SLVEFTCCRA, PVALGLAGA), divisée par la moyenne des cellules traitées avec du milieu AIM-V sans antigène. Le seuil de positivité est calculé en additionnant la moyenne des valeurs de densité optique des cellules des souris PBS stimulées avec le milieu seul et deux fois l'écart type. Les résultats ont été analysés avec un test de variance non paramétrique (Kruskal-Wallis) ainsi que le Mann-Whitney U test utilisant les résultats des souris PBS comme valeur de référence.

#### 2.14. PCR quantitatif

En se basant sur la séquence nucléotidique des *vaccinia* virus de type sauvage (vvWR) et recombinante pour l'ARFP (vvARFP), deux paires d'amorces ont été synthétisées pour la quantification de l'ADN virale dans les extraits d'ovaires de souris. La première paire d'amorces peut être utilisée pour identifier soit le *vaccinia* WR ou le vvARFP puisqu'elles sont tirées de séquences extérieures au site d'insertion de l'ARFP. Les séquences de ces amorces sont : a) TKL-S: 5' AAATAG CTC AAT ATA AAT GCG TGA 3' et b) TKL-AS: 5' TCA ACA ATG TCT GGA AAG AAC TG 3'.

L'autre paire d'amorces est spécifique pour l'insertion de l'ARFP et ne peut donc être utilisée que pour identifier vvARFP. Les séquences de ces amorces sont : a) protF-S : 5' TGT CAC CAA TGA CTG CCC TA 3' et b) TKR-AS: 5' TAC GTT GAA ATG TCC CAT CG 3'. L'ADN a été extrait des lysats d'ovaires en utilisant le DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Chaque réaction de PCR a été réalisée en présence de dNTP 200 µM ch (Invitrogen), le tampon de PCR 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Invitrogen), 1 µM des amorces TKL-S et TKL-AS, 2.5 U/50 µl de Taq DNA pol

(Invitrogen) et le volume complété à 50 µl par réaction avec du H<sub>2</sub>O Nuclease Free (Promega, Madison, Wisconsin, É-U).

Le programme de PCR était : 95 °C x 5 min, (95 °C x 1 min, 57 °C x 30 sec, 72 °C x 1 min 30 sec) pour 22 cycles, puis 72 °C x 10 min. dans un cycleur thermal TGradient (Biometra, Goettingen, Allemagne).

Les produits de PCR ont été migrés sur un gel d'acrylamide/bis 29:1 8% dans (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, É-U) pour 45 min à 50 mA par gel. Les gels ont été placés dans un bain de bromure d'éthidium (25 µl de BrEt 10 mg/ml pour 500 ml d'eau) pour 5 min et l'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide de l'Alpha Imager 1220. Des concentrations connues de *vaccinia* ont été utilisées pour établir une courbe standard permettant le calcul du nombre de pfu/ml présent dans un échantillon.

### **2.15. Test de liaison peptidique**

Une solution stock de peptides a été préparé en mélangeant 2 mg de peptide lyophilisé avec 200 µl de HBSS (Gibco – Invitrogen) + 25% DMSO + 10 mM DTT (Invitrogen). Des dilutions de 1/10 (200 µg/ml), 1/20 (100 µg/ml) et 1/60 (30 µg/ml) de la solution stock ont été préparées pour l'essai. Le test de stabilisation de CMH de classe 1 s'est fait avec la lignée cellulaire T2. Cette lignée provient de lymphoblastes humains déficients pour les gènes du complexe TAP et expriment des molécules de CMH de classe 1, dont la molécules HLA-A2 Crumpacker et al., 1992). Les cellules ont été maintenues dans du DMEM (Gibco-Invitrogen) supplémenté avec 20% SVF + gentamycine. Le jour précédant l'essai, les cellules ont été comptées et ajustées à une concentration de  $0.8-1.0 \times 10^6$  cellules/ml dans du DMEM-3% SVF + gentamycine et incubées à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Le jour de l'essai, les cellules ont été comptées et placées dans

du DMEM-3% à une concentration de 100, 000 cellules/160  $\mu$ l. 160  $\mu$ l de cellules ont été placées dans chaque puits d'une plaque à 96 puits à fond rond; trois puits ont été préparés par dilution de peptides, pour un total de neuf puits par peptide. 40  $\mu$ l des dilutions de peptides (200  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 30  $\mu$ g/ml) ont été placées dans le puits appropriés et la plaque a été incubée pour 16 heures à 37 °C 5% CO<sub>2</sub>. Ensuite, les cellules ont été enlevées de la plaque et mises dans des tubes à FACS (BD Falcon), lavées avec 4 ml de PBS - 2% SVF et centrifugées pour 10 min à 1500 x g. Ensuite, les cellules ont été marquées avec 7  $\mu$ l de l'anticorps anti-CMH de classe 1 W6/32 (Sigma) et incubées à la noirceur pour 30 minutes. Les cellules ont été lavées avec 4 ml de PBS – 2% SVF et centrifugées à 1500 x g pour 10 min. Le culot a été resuspendu dans 150  $\mu$ l de paraformaldéhyde 2.5% et stocké à l'obscurité à 4 °C jusqu'à l'analyse. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un FACS Calibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, La Jolla, CA, É-U) et le programme Cell Quest Pro. Le contrôle positif qui a été utilisé est le peptide 1406 de la protéine NS3 du VHC et, comme contrôle négatif, les cellules non stimulées ont été utilisées.

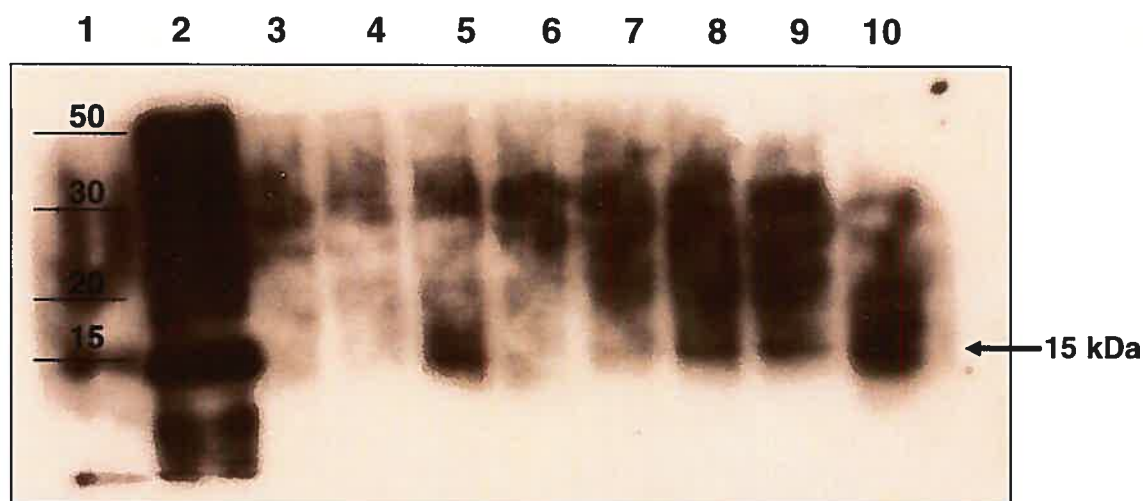
## **Chapitre III : Résultats**

### 3.1. Expression de l'ARFP dans le contexte d'une infection avec le vvARFP

La technique d'infection par le virus de la vaccine et la quantification de la charge virale au niveau des ovaires est une méthode efficace pour dériver des corrélats de protection (Buller et al., 1985, Karupiah et al., 1990). Pour déterminer si le vvARFP exprime bien la protéine ARFP recombinante, des cellules CV1 ont été infectées avec le virus et marquées avec un anticorps monoclonal spécifique pour la rARFP (gracieuseté de Marc Fiorucci). Dans le cas du transfert de l'immunobuvardage, l'anti-sérum de lapin a été utilisé. Étant donné l'instabilité de la rARFP, un inhibiteur de protéasome a été ajouté aux puits 2 h avant l'essai d'immunofluorescence ou l'immunobuvardage.

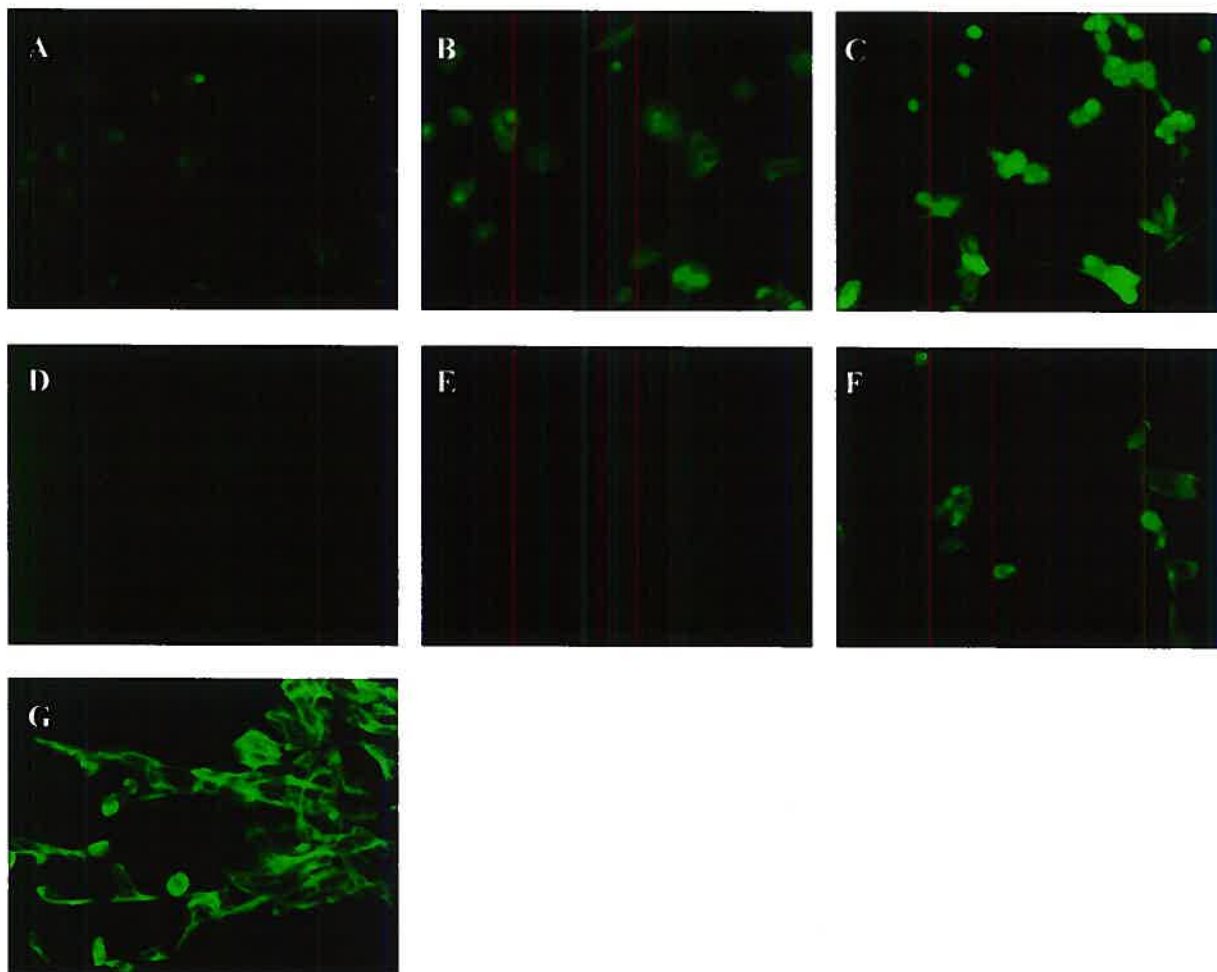
L'immunobuvardage a révélé qu'il y avait expression de l'ARFP dans les cellules infectées avec vvARFP (avec ou sans inhibiteur de protéasome), mais seulement quand les membranes ont été incubées avec les anticorps polyclonaux (anti sérum de lapin) (Figure 3.1). Il n'y a aucune bande détectable pour les cellules infectées avec le *vaccinia* WR.

L'immunofluorescence faite sur les cellules infectées a démontré que les cellules infectées avec le vvARFP expriment l'ARFP, mais que cette expression est détectée avec l'anticorps monoclonal seulement en présence de l'inhibiteur de protéasome (MG132) (Figure 3.2C). Les cellules infectées avec le *vaccinia* WR ont une fluorescence plus forte (Figure 3.2F) que les cellules non-infectées (Figure 3.2A), mais un peu moins que celles infectées avec le vvARFP en présence de MG132. L'anticorps polyclonal a été essayé en immunofluorescence, mais menait à une fluorescence très faible (résultats non illustrés).



**Figure 3.1 : Expression de l'ARFP dans des cellules CV1 infectées avec le *vaccinia* ARFP-recombinant (vvARFP).**

Membrane anticorps polyclonal 1) BenchMark Ladder 2) rARFP (produite le 30-05-06) 3) Cellules CV1 non infectées 4) CV1 infectées avec  $10^6$  vvWR 5) CV1 infectées avec  $10^5$  pfu vvARFP 6) CV1 infectées avec  $10^5$  pfu vvARFP avec MG132 7) CV1 infectées avec  $10^6$  pfu vvARFP 8) CV1 infectées avec  $10^6$  pfu vvARFP avec MG132 9) CV1 infectées avec  $10^7$  pfu vvARFP 10) CV1 infectées avec  $10^7$  pfu vvARFP avec MG132.



**Figure 3.2 : Expression de l'ARFP dans des cellules CV1 infectées avec le *vaccinia* ARFP-recombinant.**

A) Cellules CV1 avec anticorps primaire monoclonal. B) Cellules CV1 infectées avec  $10^6$  pfu/ml vvARFP avec anticorps primaire monoclonal. C) Cellules CV1 infectées avec  $10^6$  pfu/ml vvARFP avec inhibiteur de protéasome MG132 et anticorps primaire monoclonal. D) Cellules CV1 avec  $10^6$  pfu/ml vvARFP sans anticorps primaire. E) Cellules CV1 avec  $10^6$  pfu/ml vvARFP avec inhibiteur de protéasome MG132 sans anticorps primaire. F) Cellules CV1 infectées avec vvWR (type sauvage) et anticorps primaire monoclonal. G) Cellules CV1 et anticorps anti-K8 (cytokératine), contrôle positif. Magnification de 400X et exposition de 193 ms. 8h post-infection.

### 3.2. Réponse humorale – vaccin protéique

Les sérums prélevés à des intervalles de deux semaines au courant des trois premières répétitions du protocole d'immunisation avec la protéine recombinante, (rARFP), ont été utilisés pour le test ELISA afin de quantifier le titre total d'anticorps spécifiques pour cette protéine. Dans les trois cas, de nombreux contrôles négatifs ont été utilisés pour déterminer le seuil de positivité (Annexe 1). Le seuil de positivité est établi à trois fois la valeur du contrôle négatif montrant la valeur la plus élevée. Les résultats des ELISAs indiquent que l'ARFP est capable de stimuler une réponse immunitaire humorale robuste et durable, 100% des souris atteignant un titre anti-ARFP de >1600 dans leur sérum dans les protocoles 1 et 2 (Figure 3.3A, B). En fait, les souris maintiennent un titre d'anticorps élevé pour les trois semaines suivants leur dernière immunisation jusqu'à leur sacrifice. Les souris du protocole 3 ont aussi produit une réponse anti-ARFP détectable, mais seulement quatre d'entre elles ont dépassé un titre sérique de 1600.

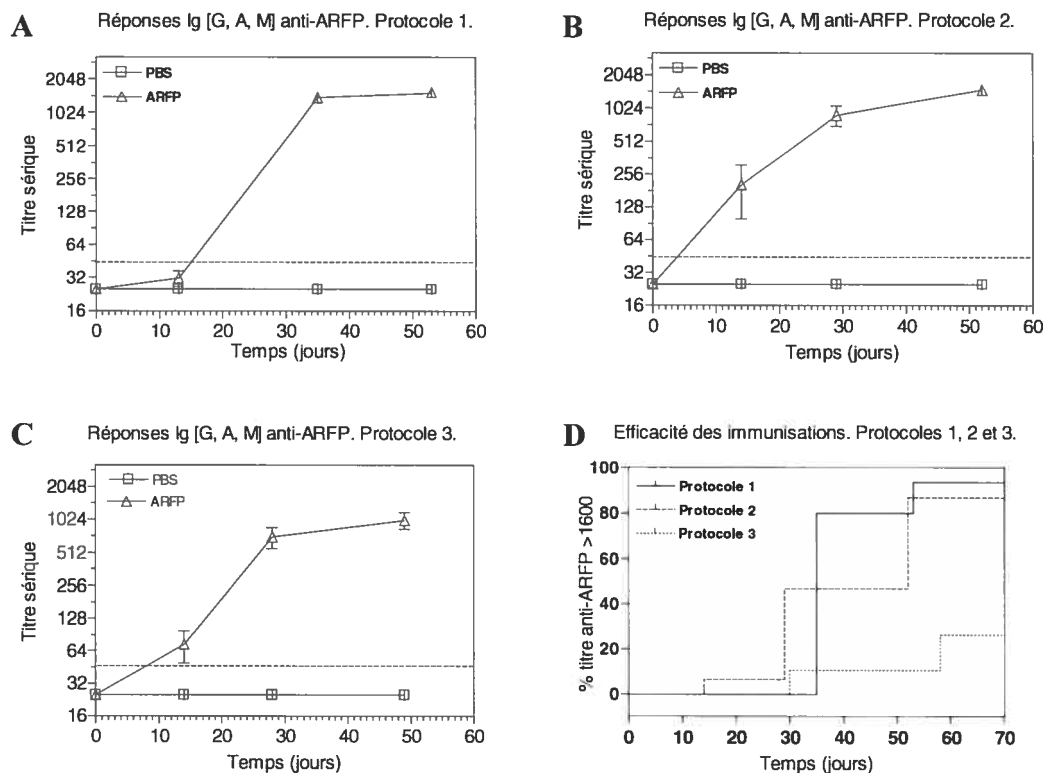
En faisant une analyse Kaplan-Meier pour évaluer l'efficacité des immunisations avec l'ARFP, on démontre clairement que les titres d'anticorps mesurés dans les sérums des souris du troisième protocole sont significativement plus faibles que lors des deux premières répétitions (Annexe 2). En effet, seulement trois souris atteignent un titre d'anticorps anti-ARFP supérieur à 1600 à la fin de l'essai.

En ce qui concerne l'isotype spécifique des anticorps anti-ARFP, des ELISA d'isotypage ont été faits avec l'échantillonnage sanguin post-mortem des souris immunisées avec l'ARFP dans les protocoles d'immunisation 3 et 4 avec l'ARFP (voir tableau 2.1). Le contrôle négatif pour ces essais était le sérum pré-immun d'une souris de



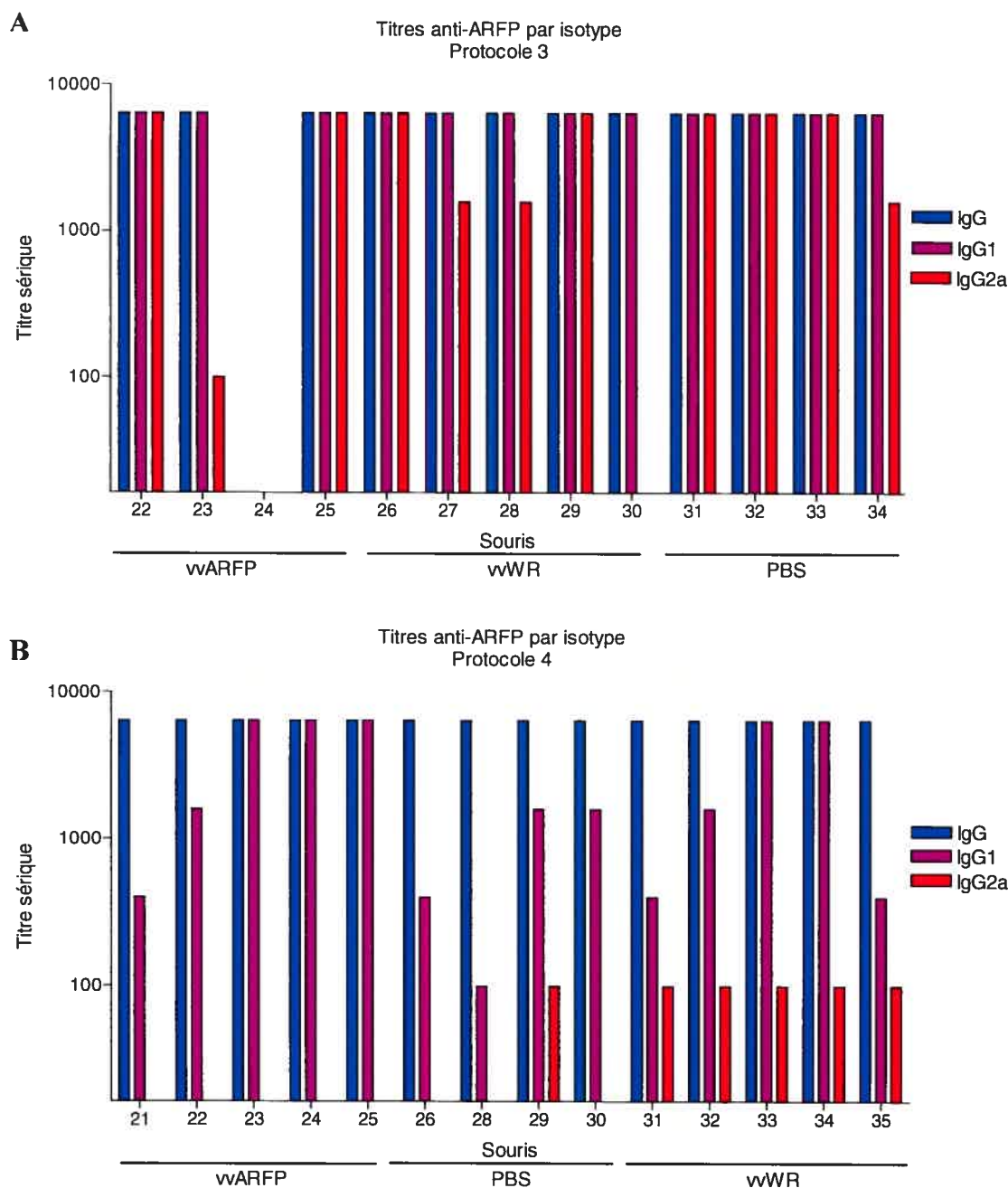
chaque groupe. Les souris dans le troisième groupe ont développé une réponse humorale robuste (titre sérique >6400) et variée. En effet toutes les souris ayant reçu une immunisation avec la rARFP avaient des titres détectables d'anticorps IgG1 et IgG2a (Figure 3.4A). L'IgG2a est un indicateur de la réponse immunitaire de type 1 et IgG1 est habituellement associé avec la réponse immunitaire de type 2 (Snapper et al., 1988, Finkelman et al., 1988, Finkelman et al., 1990). En comparaison, les souris de la quatrième répétition du protocole avaient toutes des titres d'anticorps IgG robustes, mais leurs réponses spécifiques de type IgG1 et IgG2a étaient nettement plus faibles (Figure 3.4B). Seulement 4 souris ont produites une réponse IgG2a détectable et ce sont celles qui ont été infectées avec le virus de la vaccine de type sauvage. L'IgG2a chez ces souris pourrait donc être l'indicateur d'une réponse TH1 non spécifique à l'antigène (i.e. réponse à une infection virale). La seule différence entre la protéine reçue par les souris du troisième protocole et celles de quatrième protocole c'est la méthode de purification, la protéine utilisée lors du troisième protocole n'ayant pas été purifiée de l'endotoxine. La rARFP utilisée pour le quatrième protocole a avant été purifiée par Detoxigel (Pierce), une colonne contenant de la polymyxine B, un antibiotique qui se lie aux endotoxines. La purification de la protéine par cette méthode induit l'agrégation de la protéine en solution. Ceci n'a pas affecté sa détection par l'anticorps polyclonal (élevé chez des lapins – Troesch et al., 2005), mais comme la distribution de la protéine n'était pas uniforme en solution, il se pourrait que les souris n'ont pas reçues la même quantité de protéine. Pour les étapes subséquentes, une protéine purifiée par une autre méthode a été utilisée (voir matériel et méthodes). Néanmoins, les résultats collectifs des troisièmes et quatrièmes groupes démontrent que la rARFP est capable de produire une réponse humorale variée

(IgG1 et IgG2a) chez la souris C57Bl/6. Les résultats des ELISAs et de l'isotypage indiquent que la rARFP est un immunogène efficace qui peut stimuler une réponse humorale durable chez le sujet immunisé.



**Figure 3.3 : Études d'immunisations ARFP chez la souris C57Bl/6.**

Panels A, B, et C représentent la production d'immunoglobulines totale pour les groupes de souris C57Bl/6 des protocoles 1-3 immunisés avec la rARFP. D) L'efficacité des immunisations administrées lors des protocoles 1, 2 et 3 (analyse Kaplan-Meier). La comparaison des courbes individuelles est présentée dans l'Annexe 2. Le seuil de positivité est établi à trois fois la valeur du contrôle négatif montrant la valeur la plus élevée. (Tableaux contrôles - Annexe 1).



**Figure 3.4 : Isotypage des réponses IgG anti-ARFP des souris C57Bl/6 immunisées avec la rARFP.**

A) Souris immunisées avec la rARFP dans le protocole 3

B) Souris immunisées avec la rARFP dans le protocole 4;

Le seuil de positivité a été déterminé en prenant trois fois la moyenne des valeurs de densité optique du sérum pré-immun.

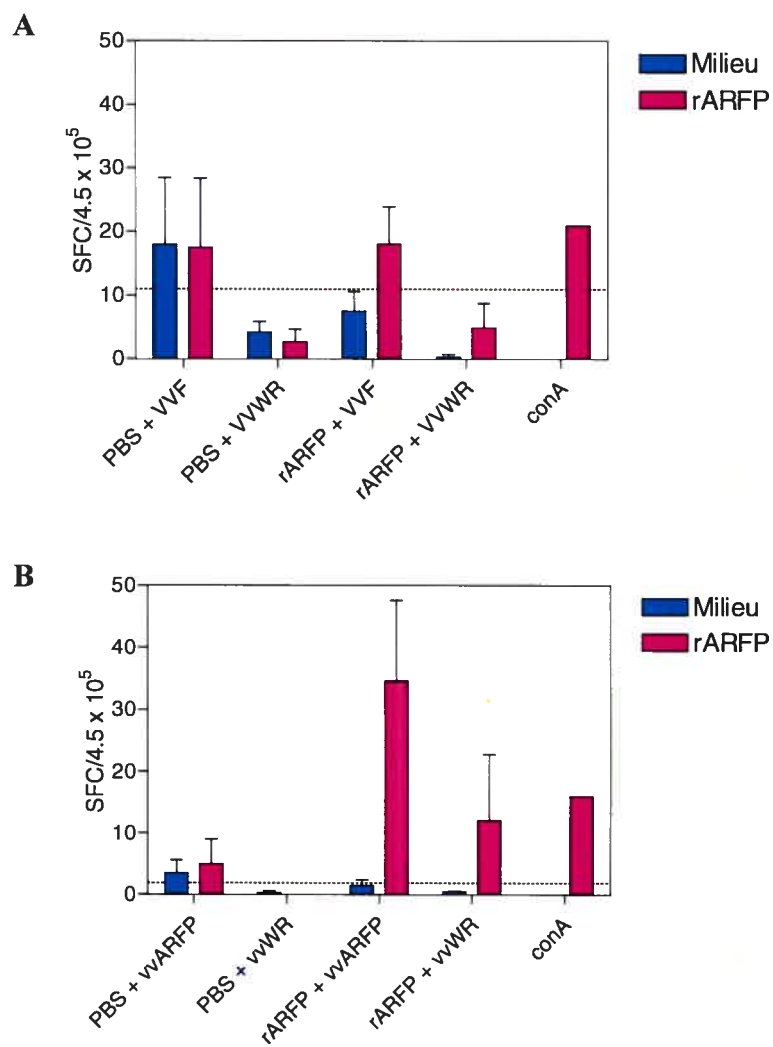
### 3.3. Réponse cellulaire – vaccin protéique

Les rates des souris des protocoles 2 à 4 ont été récoltées et les splénocytes isolés. Lors de l'essai ELISpot pour les souris des répétitions 2 et 3, le nombre de cellules récupérées n'était pas optimal ( $<250,000$  cellules par puits – optimal :  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ ) pour l'essai. Les ELISpots ont été faits tout de même, mais sans aucun résultat (bruit de fond trop élevé). Les splénocytes des souris du protocole 4 ont été isolées par une méthode différente (lyse de globule rouge) et la perte de cellules a été moins importante. L'essai a ainsi été fait avec 450,000 cellules par puits et les plaques incubées pour 24 heures avec du milieu seul ou avec 2  $\mu\text{g/ml}$  de la rARFP. Le contrôle positif, la concanavaline A, est un mitogène puissant et qui induit la production de cytokines d'une façon indépendante de l'immunisation avec la rARFP. Les résultats de l'ELISpot indiquent que la production d'IFN-  $\gamma$  est nettement plus élevée chez les souris immunisées avec la rARFP (Figure 3.5B) que chez celles ayant reçu des injections de PBS. De plus, les souris immunisées avec la rARFP et infectées avec le vvARFP ont des fréquences de cellules productrices d'IFN-  $\gamma$  plus élevées (moyenne de 34.60 SFC/1 million de cellules) que les souris immunisées avec la rARFP et infectées avec le *vaccinia* WR (12.10 SFC/1 million de cellules) ou le PBS (6.75 SFC/1 million de cellules). Par contre ces différences ne sont pas significatives au niveau statistique ( $P = 0.0545$ , Kruskal-Wallis test), due en grande partie à la petite taille des groupes ainsi que la variabilité des résultats. Ceci n'empêche pas qu'une tendance de spécificité de la réponse cellulaire pour l'antigène (vvARFP) correspondant à la même protéine avec laquelle les souris ont été immunisées peut être observée.

La production d'IL-4 indique également que l'immunisation avec l'ARFP augmente la production de cette cytokine après une stimulation avec le même antigène (rARFP) (Figure 3.5A). En effet, comme pour l'IFN- $\gamma$ , les souris qui ont été infectées avec le vvARFP ont une production d'IL-4 supérieure aux autres groupes de souris immunisées avec l'ARFP ( $P = 0.0278$ , Mann-Whitney U test; rARFP + vvARFP *versus* rARFP + vvWR).

**Figure 3.5 : Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  des splénocytes des souris C57Bl/6 du protocole 4.**

A) Production d'IL-4. B) Production d'IFN- $\gamma$ . Les souris ont été immunisées avec la rARFP ou du PBS et infectées avec le *vaccinia* ARFP-recombinant (vvARFP) ou le *vaccinia* de type sauvage (vvWR). Le contrôle positif est la concanavaline A.. Nombre de souris dans chaque groupe = 4. Le seuil de positivité est calculé en additionnant la moyenne des spots des cellules des souris PBS stimulées avec le milieu seul et deux fois l'écart type.



### 3.4. Charge virale – vaccin protéique

Un test de plaques avec des lysats d'ovaires a été utilisé pour déterminer la charge virale des souris après une infection avec le virus de la vaccine (sauvage ou recombinant). Les deux premiers protocoles d'immunisation n'ont résulté en aucune formation de plaque de lyse, le virus de la vaccine inoculé ( $10^7$  pfu/ml par voie intravaginale) n'ayant pas pu établir d'infection détectable. Deux protocoles d'optimisation ont été complétés afin de déterminer la dose adéquate de virus à être inoculé et la voie la plus efficace d'inoculation (intrapéritonéale *versus* intravaginale). Les résultats des deux protocoles ont démontré que l'inoculum minimal pour que toutes les souris soient infectées était de  $2.5 \times 10^7$  pfu/souris. Étant donné les contraintes de volume lors de l'administration par voie intravaginale, le mode d'infection intrapéritonéal a été utilisé pour les protocoles subséquents (résultats non illustrés).

Le troisième protocole a donc été fait avec une infection *vaccinia* de  $2.5 \times 10^7$  pfu/souris par voie intrapéritonéale. Les résultats des tests de plaques indiquent que les souris immunisées avec la rARFP et infectées avec le *vaccinia* recombinant pour l'ARFP (vvARFP) ont une charge virale significativement ( $P = 0.0159$ , Mann-Whitney U test) plus faible que les souris non immunisées infectées avec le vvARFP (Figure 3.6A). Les souris immunisées avec la rARFP et infectées avec le virus de la vaccine de type sauvage (vvWR) n'ont pas de différence significative ( $P = 0.2738$  Mann-Whitney U test) au niveau de la charge virale quand comparées au souris non immunisées et infectées avec le *vaccinia* WR (Figure 3.6B).

La même expérience a été répétée lors du quatrième protocole. Cette fois-là, la protéine purifiée par Detoxigel a été utilisée, comparativement aux trois autres protocoles



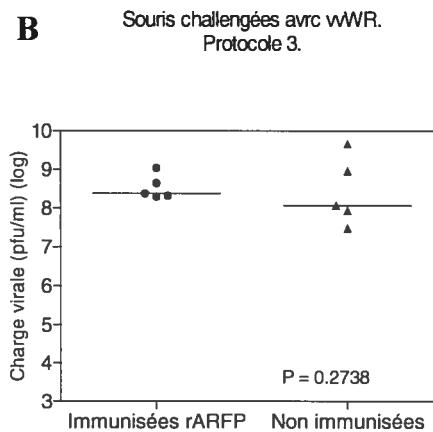
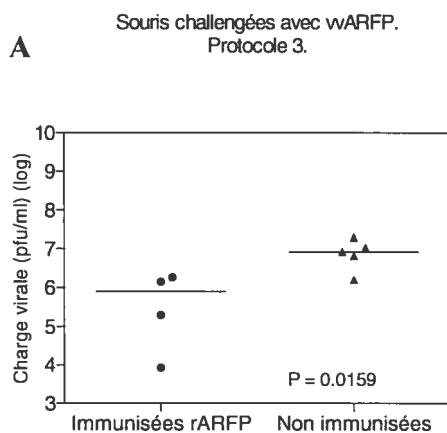
où la protéine ne l'était pas. Le challenge *vaccinia* a été administré de la même façon que lors du protocole précédent et le même volume et la même dose de virus ont été utilisés. Contrairement au troisième protocole, les résultats du quatrième protocole indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris immunisées et non immunisées qui ont reçu un challenge avec le vvARFP ( $P = 0.4524$ , Mann-Whitney U test) (Figure 3.7A). Comme la fois précédente, il n'y avait aucune différence entre la charge virale des souris immunisées et non immunisées infectées avec le vvWR ( $P = 0.2734$ , Mann-Whitney U test) (Figure 3.7B).

En regroupant les résultats des protocoles 3 et 4, on observe que les souris immunisées ont une charge virale inférieure à celle retrouvée chez les souris non-immunisées en réponse au challenge avec le vvARFP (Figure 3.8). Cette différence n'est pas significative ( $P = 0.0807$ , Mann-Whitney U test). Par contre, on observe une réduction de la charge virale des souris immunisées avec la rARFP et infectées avec le vvARFP en comparaison aux autres groupes.

**Figure 3.6 : Protection contre un challenge *vaccinia* chez les souris immunisées. Protocole 3.**

A) Souris infectées avec le *vaccinia* ARFP-recombinant (vvARFP).

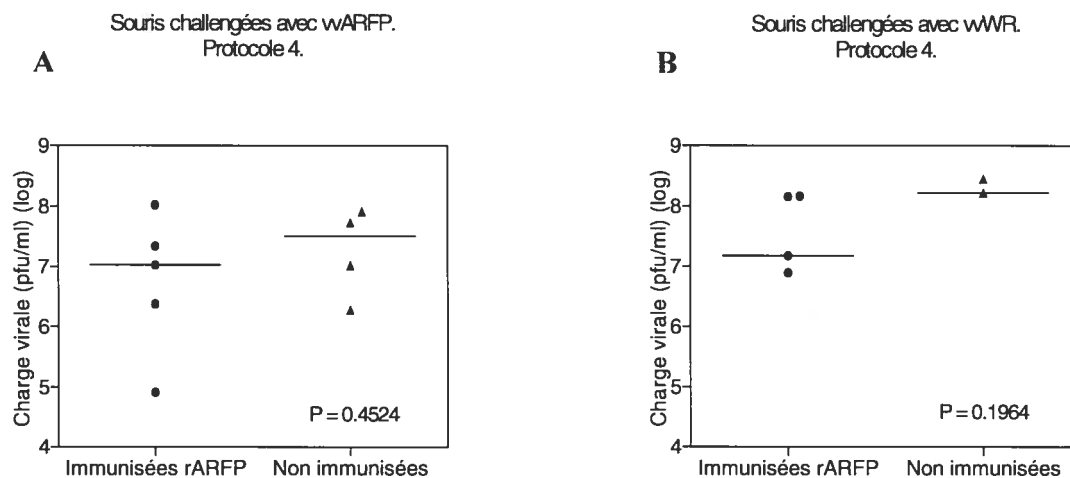
B) Souris infectées avec le *vaccinia* de type sauvage. Charge virale déterminée à l'aide d'un test de plaques avec les ovaires de chaque souris.

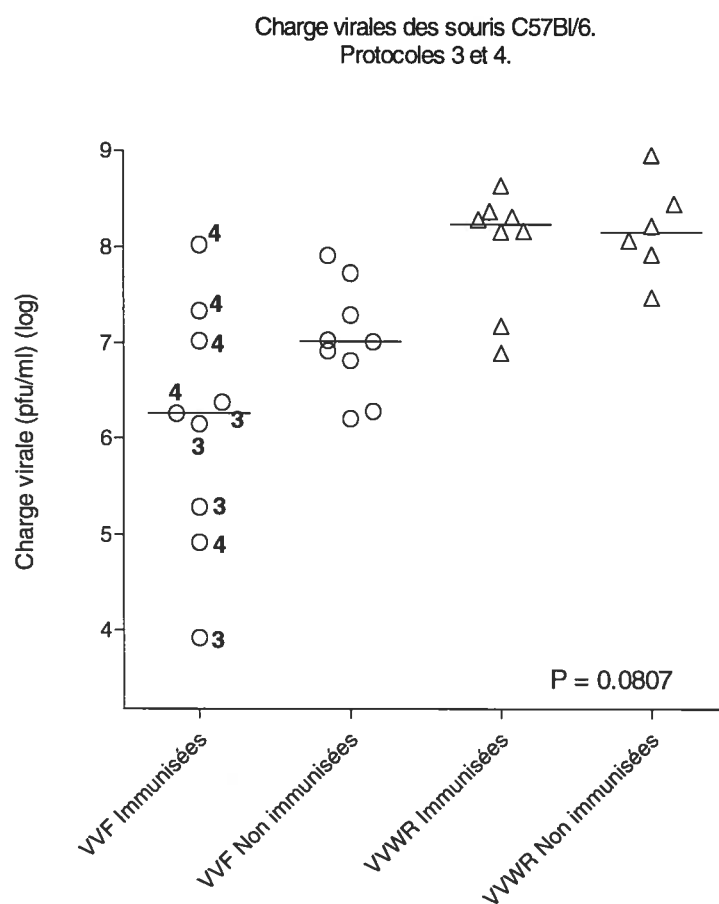


**Figure 3.7 : Protection contre un challenge *vaccinia* chez les souris immunisées. Protocole 4.**

A) Souris infectées avec *vaccinia* ARFP-recombinant (vvARFP).

B) Souris infectées avec vaccina de type sauvage (vvWR).





**Figure 3.8 : Protection contre un challenge *vaccinia* chez des souris C57Bl/6 immunisées. Protocoles 3 et 4.**

Les souris ont été immunisées avec la rARFP ou du PBS et infectées avec le *vaccinia* ARFP recombinant (vvARFP) ou de type sauvage (vvWR). Les chiffres en caractère gras indiquent le protocole de vaccination. Charges virales déterminées à l'aide d'un test de plaques sur les ovaires des souris.

### 3.5. Charge virale par PCR quantitatif après vaccin protéique

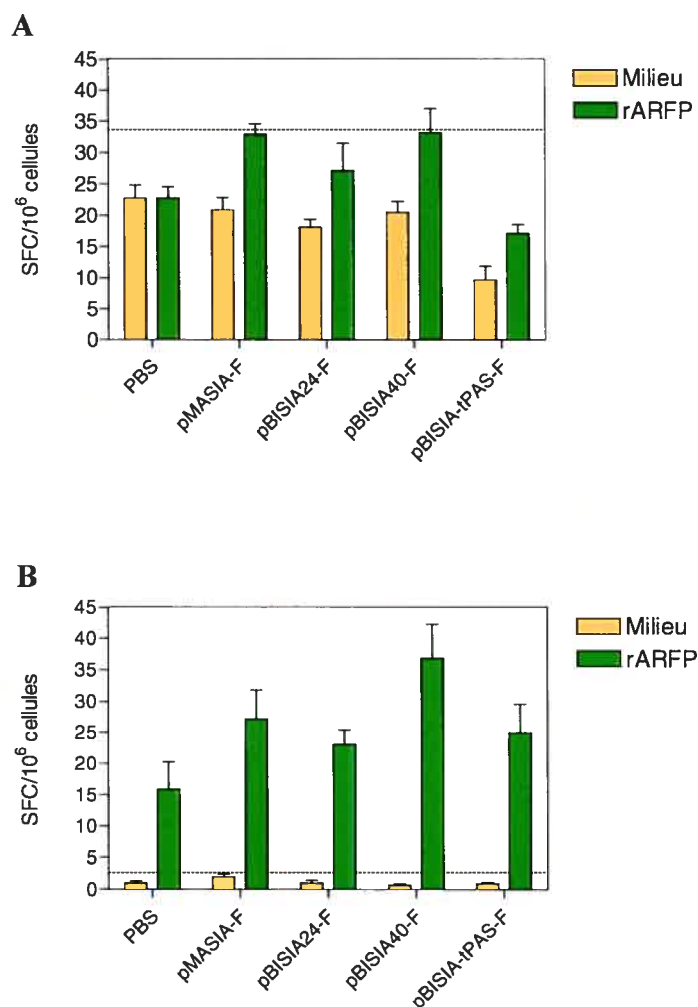
La charge virale des souris de toutes les répétitions du protocole d'immunisation avec la rARFP a été analysée par PCR quantitatif (qPCR) en se basant sur une courbe standard établie avec des concentrations connues de *vaccinia* WR (mise au point faite au laboratoire). Pour des charges virales de l'ordre de  $10^7$  ou  $10^8$  pfu, les résultats de la qPCR étaient concordants avec ceux des tests de plaques (Annexe 3). Cependant pour les charges virales dans l'ordre de  $10^4$  ou  $10^5$  pfu il n'y avait souvent aucune bande détectable. Même en augmentant la quantité d'ADN dans le mélange réactionnel, il n'y avait aucune détection d'ADN pour ces échantillons (i.e. problème de sensibilité). C'est pour cette raison, que les résultats de qPCR ne sont pas inclus dans l'analyse finale de l'efficacité du vaccin protéique.

### 3.6. Choix du vecteur pour le vaccin à ADN

Le but du protocole 5 (voir tableau matériel et méthodes) était de choisir le vecteur à ADN qui produisait une réponse immunitaire optimale (i.e. des réponses cellulaire et humorale spécifiques à la rARFP). Quatre vecteurs ont été testés : pMASIA-F, pBISIA24-F, pBISIA40-F, pBISIA-tPAs-F (tous ces plasmides sont décrits dans Yu et al., 2004). Ces vecteurs ont été assemblés à partir de la séquence complète de l'ARFP, qui a été incorporée dans des vecteurs contenant différents éléments aux propriétés immunomodulatrices, dont : a) des motifs CpG (vecteurs pBISIA24 et pBISIA40); et b) la séquence activatrice du tissu plasminogen activator (TPA). Dans certains cas, les vecteurs ont été utilisés en présence d'oligodésoxyribonucléotides CpG (CpG ODN). La réponse humorale a été analysée par ELISA. Seul pMASIA-F a réussi à produire une réponse positive au niveau des titres d'IgG, et ce seulement chez 2 souris sur 5 (résultats

non illustrés). Pour évaluer la réponse cellulaire induite par ce vecteur, un ELISpot pour déterminer la production d'IL-4 et IFN-  $\gamma$  a été effectué ainsi qu'un test de prolifération en présence du réactif MTT (sel de tétrazolium). L'ELISpot a démontré que tous les vecteurs induisent la production des cytokines IL-4 (Figure 3.9A) et IFN-  $\gamma$  (Figure 3.9B), mais que les vecteurs pMASIA-F et pBISIA40-F produisent une réponse supérieure. En effet seulement pBISIA40-F produit une réponse statistiquement supérieure ( $P = 0.0163$ , Mann-Whitney U test). Le test de prolifération en présence du réactif MTT a démontré que le vecteur pBISIA40-F induisait une plus forte prolifération des splénocytes isolés des souris (Figure 3.10), les trois autres vecteurs s'étant comportés d'une façon équivalente. Les échantillons provenant du groupe PBS ont été contaminés pendant l'isolation des splénocytes suite à un mélange d'étiquettes. Pour cette raison, dans tous les essais de ce protocole, le groupe PBS réagit d'une manière positive (sauf en ELISA).

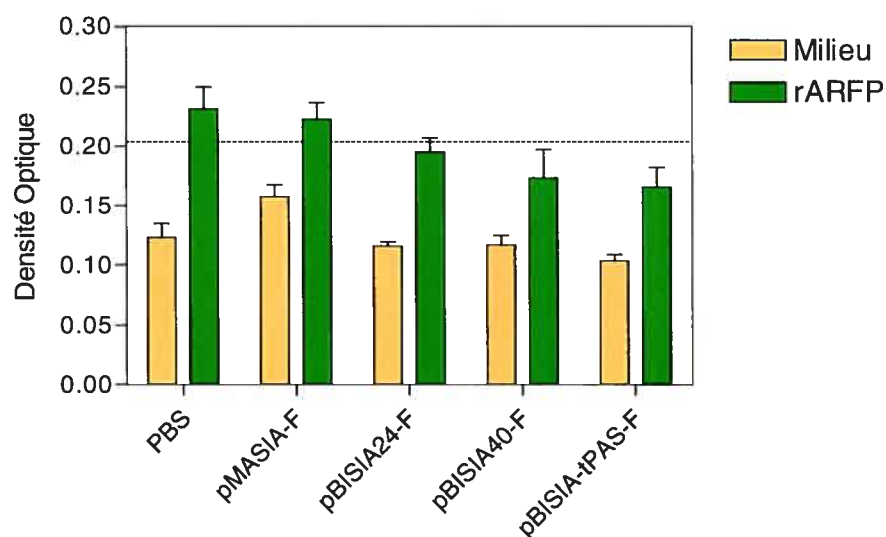
Le vecteur pMASIA-F a été choisi pour les protocoles subséquents parce qu'il a été le seul des 4 à induire une réponse humorale (faible), ainsi que des réponses cellulaires supérieures aux autres vecteurs.



**Figure 3.9 : Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1 immunisées avec des vecteurs à ADN exprimant l'ARFP.**

A) Production d'IL-4 après stimulation avec du milieu AIM-V ou la rARFP. B) Production d'IFN- $\gamma$  après stimulation avec du milieu AIM-V ou la rARFP. Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  déterminée à l'aide d'un ELISpot. Les valeurs sont des moyennes par groupe ( $n = 4$ ) et la valeur pour chaque souris représente une moyenne de trois puits. Le seuil de positivité est calculé en additionnant la moyenne des spots des cellules des souris PBS stimulées avec le milieu seul et deux fois l'écart type.

**Figure 3.10 : Prolifération des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1 immunisées avec des vecteurs à ADN exprimant l'ARFP.** Prolifération cellulaire déterminée par incorporation du réactif MTT. Moyenne de densité optique regroupée par immunisation de vecteur à ADN reçu. Lecture à 405 nm. Souris par groupe = 4. Le seuil de positivité est calculé en additionnant la moyenne des spots des cellules des souris PBS stimulées avec le milieu seul et deux fois l'écart type.

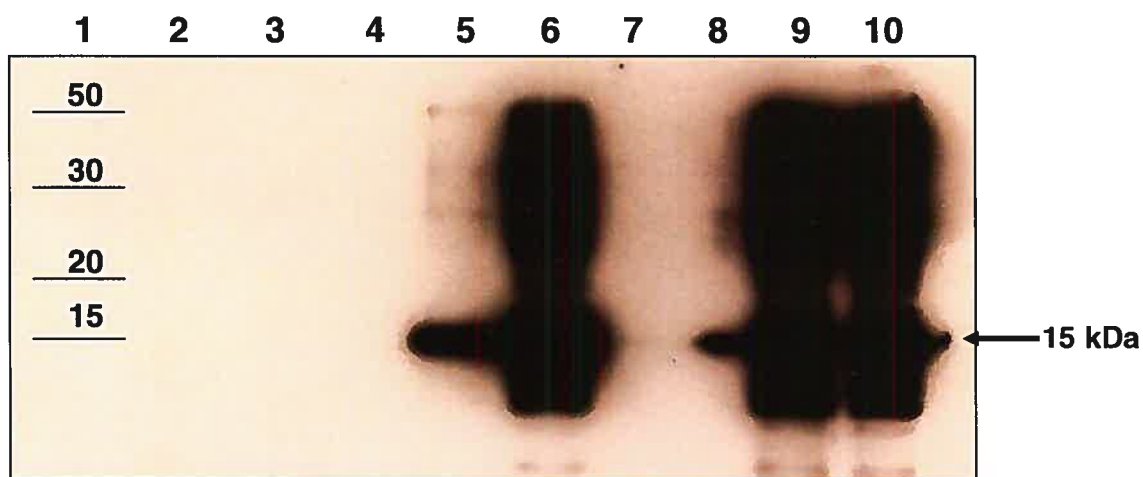




### 3.7. Expression de l'ARFP dans le vecteur à ADN pMASIA-F

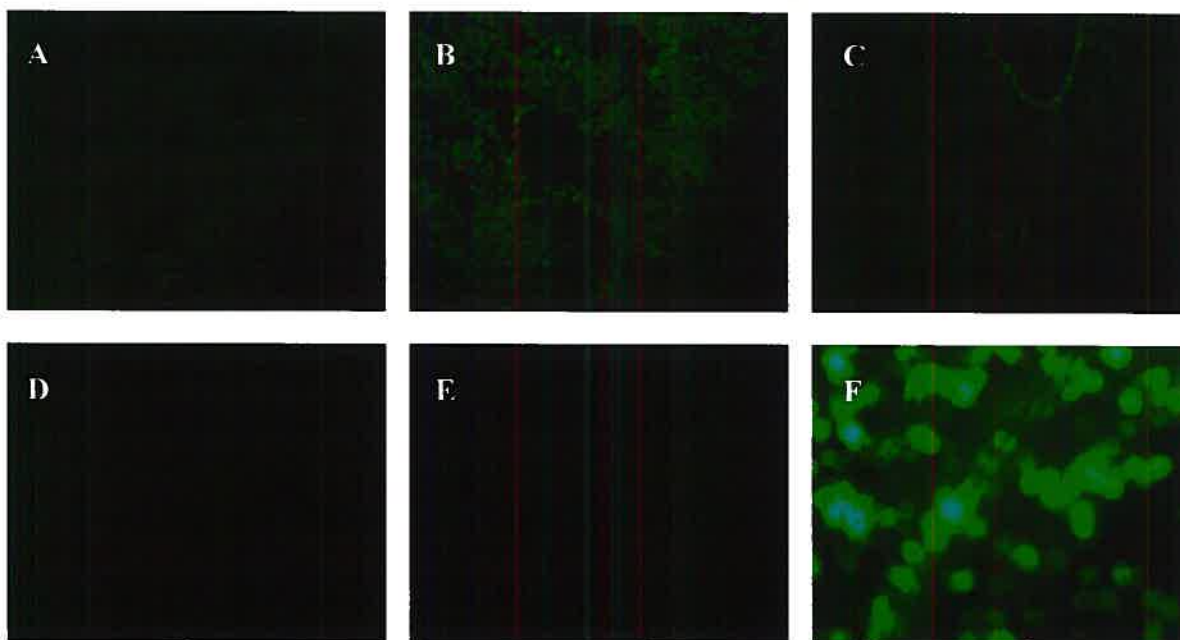
Des cellules HEK 293 ont été transfectées avec le vecteur à ADN pMASIA-F pour s'assurer que le vecteur qui a été choisi exprimait bien l'ARFP. Les cellules transfectées ont été analysées par immunobuvardage ainsi que par immunofluorescence indirecte. L'immunobuvardage a été fait sur le culot et le surnageant de cellules transfectées en présence ou non de l'inhibiteur de protéasome MG132. L'incubation avec l'anticorps polyclonal (sérum de lapin immunisé) a démontré qu'il y a de l'expression de l'ARFP dans les cellules transfectées en présence de MG132 (Figure 3.11). Par contre, aucune bande n'a été détectée avec l'anticorps monoclonal.

L'immunofluorescence indirecte a révélée la production d'ARFP dans les cellules transfectées avec le vecteur pMASIA-F, mais seulement en présence de MG132 marquées avec l'anticorps monoclonal anti-ARFP (Figure 3.12B). Sans inhibiteur de protéasome, la fluorescence est à peine détectable (Figure 3.12), ce qui vient supporter la notion que l'ARFP a une très courte demi-vie et qu'elle est généralement exprimée à bas niveaux (Xu et al., 2003).



**Figure 3.11 : Expression de l'ARFP dans des cellules HEK 293 transfectées avec le vecteur pMASIA-F – Immunobuvardage avec anticorps polyclonal.**

1) BenchMark Ladder 2) BSA 3) culot de cellules HEK + pMASIA-F 4) surnageant cellules HEK + pMASIA-F 5) Fraction C rARFP (30-05-06) 6) Fraction D1+D2 rARFP (30-05-06) 7) culot de cellules HEK + pMASIA-F et MG132 8) surnageant cellules HEK + pMASIA-F et MG132 9) Fraction E1+E2 rARFP (30-05-06) 10) Fraction E3+E4 rARFP (30-05-06).



**Figure 3.12 : Expression de l'ARFP du vecteur à ADN pMASIA-F dans les cellules HEK 293 – Immunofluorescence indirecte.**

A) Cellules HEK avec le vecteur pMASIA-F et l'anticorps primaire monoclonal. B) Cellules HEK avec le vecteur pMASIA-F avec l'inhibiteur de protéosome MG132 et l'anticorps primaire monoclonal. C) Cellules HEK et l'anticorps primaire monoclonal. D) Cellules HEK avec le vecteur pMASIA-F sans anticorps primaire. E) Cellules HEK avec le vecteur pMASIA-F et l'inhibiteur de protéosome MG132 sans l'anticorps primaire. F) Cellules HEK et GFP, contrôle de transfection. Magnification de 100X et exposition de 544 ms pour toutes les lames.

### 3.8. Protocole Prime-« boost » pour le vaccin à ADN

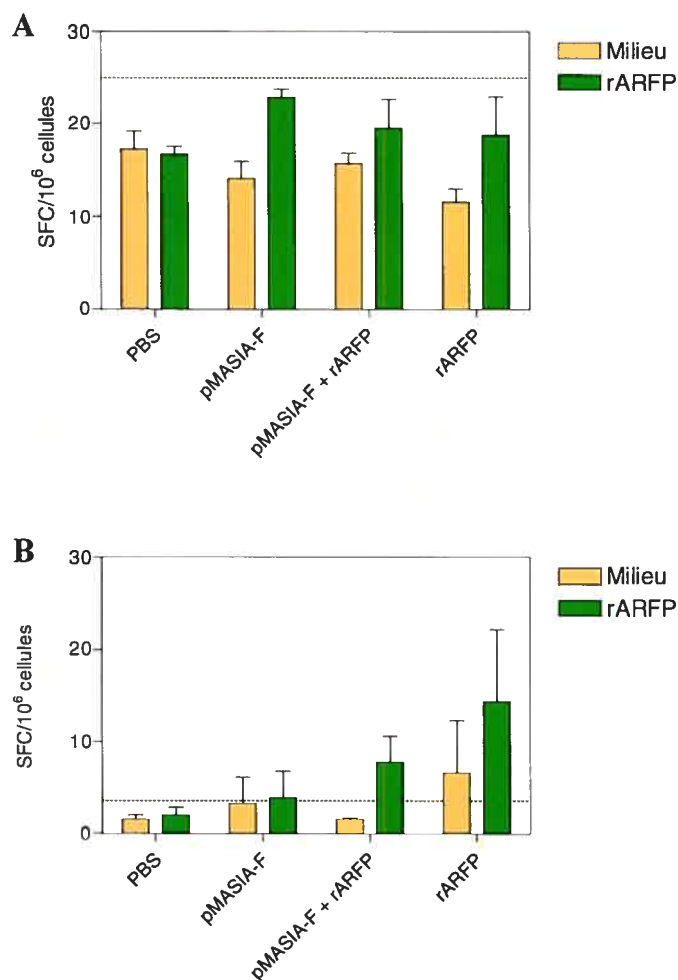
Le protocole 6 (voir tableau matériel et méthodes) a été fait pour évaluer l'efficacité de la méthode prime-« boost » pour le vaccin à ADN. Cette méthode consiste à administrer une série de trois immunisations avec le vecteur pMASIA-F, et, au moment de la dernière immunisation de faire un boost avec la rARFP. Des groupes contrôles qui ont reçu soit seulement le vecteur ou la protéine ont été utilisés. Comme pour le protocole de sélection du vecteur, les réponses humorales ont été quantifiées par ELISA et les réponses cellulaires par ELISpot et prolifération avec le réactif MTT.

Les résultats de l'ELISpot ont démontrés que la vaccination avec le vecteur pMASIA-F en conjonction avec un « boost » rARFP stimule les splénocytes à produire presque autant d'IFN- $\gamma$  ( $6.26 \text{ SFC}/10^6$  au dessus de la moyenne des même cellules stimulées avec du milieu) que la vaccination avec la rARFP seule ( $7.76 \text{ SFC}/10^6$ ), mais plus que le vecteur seul ( $0.59 \text{ SFC}/10^6$ ) (Figure 3.13B). Les moyennes ne varient pas de manière significative ( $P = 0.1848$  Kruskal-Wallis test), dû en grande partie à la variabilité des valeurs observées chez les souris immunisées avec la rARFP. Pour de la sécrétion d'IL-4, il semblerait que le pMASIA-F inoculé seul est le plus efficace pour induire la production de cette cytokine ( $8.75 \text{ SFC}/10^6$  au dessus de la moyenne de stimulation avec du milieu) quand comparé aux groupes immunisés avec la rARFP seule ( $7.17 \text{ SFC}/10^6$ ) ou le prime-boost ( $3.65 \text{ SFC}/10^6$ ) (Figure 3.13A), même si aucun de ces groupes n'atteint le seuil de positivité (moyennes des valeurs des splénocytes de souris PBS stimulées avec du milieu seul plus deux fois l'écart type). Les résultats de l'ELISpot pour ce protocole d'immunisation étaient généralement plus faibles que lors du premier protocole (choix de

vecteur), mais ils démontrent quand même la supériorité du « boost » protéique *versus* l'immunisation avec le vecteur seul.

La prolifération cellulaire mesurée par le réactif MTT n'a pas donné de résultats concluants, étant donné que le groupe PBS (contrôle) a proliféré plus que les cellules isolées des rates de souris immunisées avec le vecteur, la protéine ou les deux (Figure 3.14), et qu'aucun des groupes n'ait atteint le seuil de positivité.

Les résultats de l'ELISA indiquent que la protéine administrée seule est plus efficace en termes de production d'une réponse humorale. En effet, toutes les souris immunisées avec trois doses de 5 µg de rARFP ont produit une réponse IgG total avec un titre sérique supérieur à 10 000, tandis que seulement deux souris vaccinées avec pMASIA-F et un « boost » protéique ont produites une réponse IgG détectable (Figure 3.15).



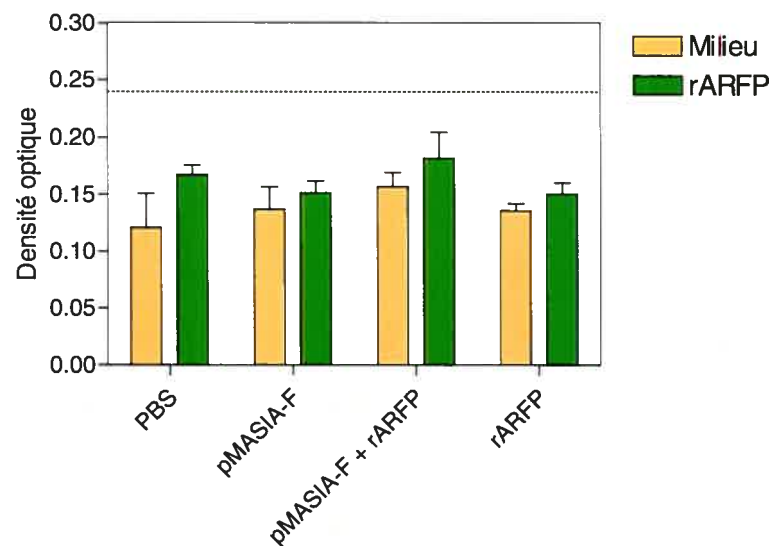
**Figure 3.13 : Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1. Protocole 6 : prime-boost.**

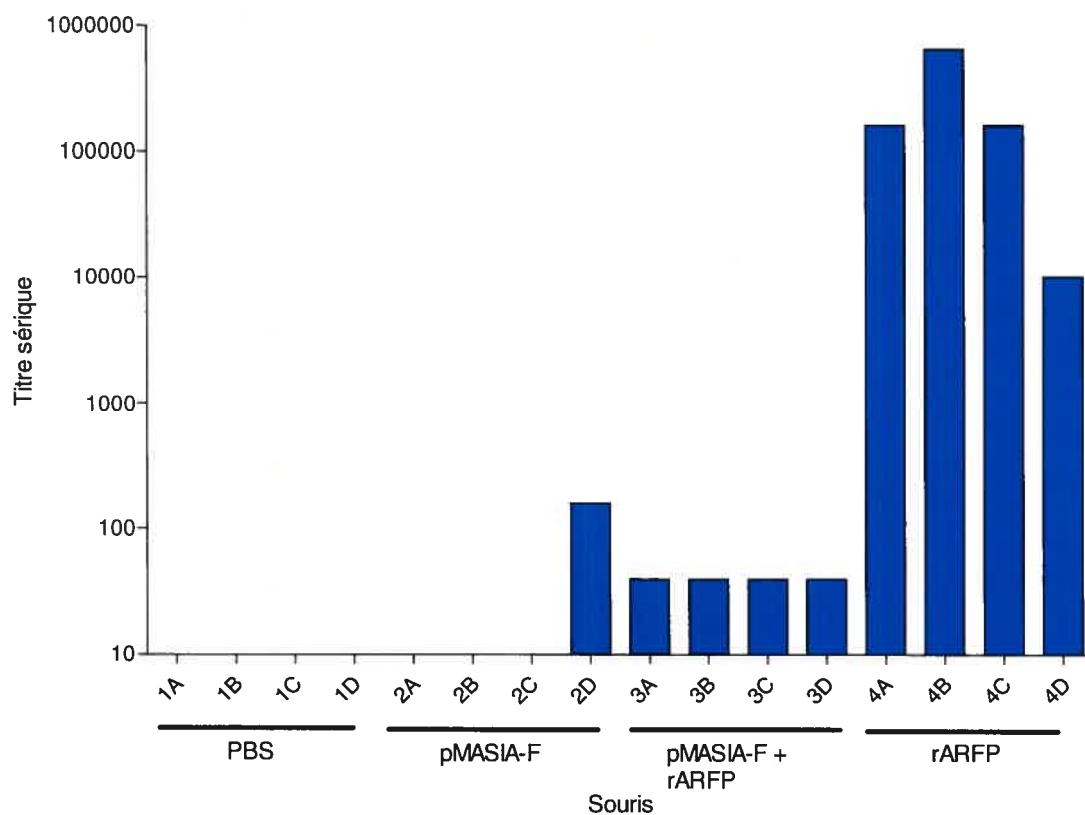
A) Production d'IL-4 après stimulation avec du milieu AIM-V ou la rARFP

B) Production d'IFN- $\gamma$  après stimulation avec du milieu AIM-V ou la rARFP. Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  déterminée à l'aide d'un ELISpot. Les valeurs sont des moyennes par groupe ( $n = 4$ ) et la valeur pour chaque souris représente une moyenne de trois puits. Le seuil de positivité est calculé en additionnant la moyenne des spots des cellules des souris PBS stimulées avec le milieu seul et deux fois l'écart type.

**Figure 3.14 : Prolifération des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1 immunisées. Protocole 6 : prime-boost.**

Prolifération cellulaire déterminée par incorporation du réactif MTT. Lecture de densité optique à 405 nm. Souris par groupe = 4. Le seuil de positivité est calculé en prenant la valeur de la densité optique moyenne des souris PBS stimulées avec le milieu seul, plus deux fois l'écart type.





**Figure 3.15 : Production d'IgG totale des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1 pour le protocole 6 (prime-boost) avec le vecteur à ADN pMASIA-F.**

Échantillons pris en post-mortem. Seuil de positivité calculé en prenant la moyenne des échantillons pré-immuns plus 2 fois l'écart type.



### 3.9. Protocole challenge *vaccinia* vaccin à ADN

Pour le protocole 7, la même stratégie d'immunisation que le protocole 6 a été utilisée (voir matériel et méthodes). Trois semaines après la dernière immunisation, la moitié de chaque groupe de souris ( $n = 8$ ) a été infectée avec  $10^7$  pfu d'un virus de la vaccine de type sauvage (vvWR) et l'autre moitié a été infectée avec  $10^7$  pfu du virus de la vaccine ARFP-recombinant. Six jours suivant l'infection avec le *vaccinia*, les souris ont été sacrifiées et leurs ovaires et leurs rates ont été récoltés.

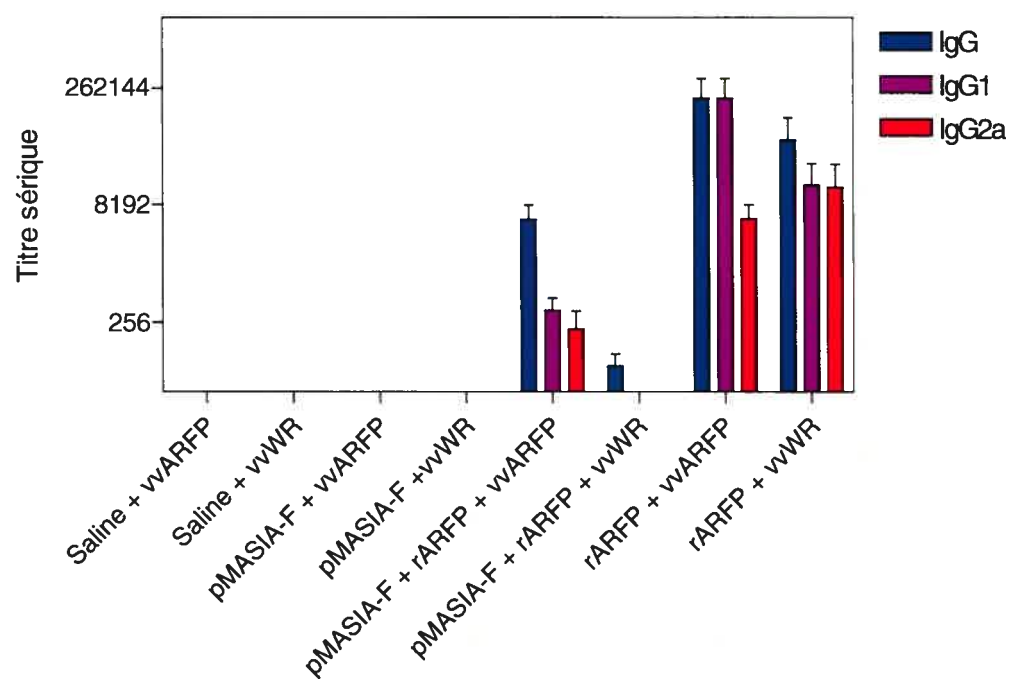
Les échantillons de sérum prélevé au courant du protocole ont été analysés par ELISA. Les résultats indiquent que les souris immunisées avec la rARFP seul ou en « boost » suivant une série d'immunisations avec pMASIA-F ont des titres d'anticorps (IgG, IgG1 et IgG2a) détectables (Figure 3.16). De plus, les souris qui ont été infectées avec vvARFP ont une production d'anticorps anti-ARFP supérieure aux souris infectées avec le vvWR. Les souris immunisées avec pMASIA-F seul n'ont pas produit de titre détectable d'anticorps spécifiques pour l'ARFP.

Les résultats de l'ELISpot avec les splénocytes des souris ont révélé que les souris immunisées avec pMASIA-F et avec rARFP, produisent en moyenne plus d'IFN- $\gamma$  (40.66 SFC/ $10^6$  au dessus de la moyenne des même cellules stimulées avec du milieu) que les souris immunisées avec la rARFP (36.54 SFC/ $10^6$ ) ou pMASIA-F seul (33.34 SFC/ $10^6$ ) (Figure 3.17B) et restimulées avec la rARFP. Par contre, ces différences ne sont pas significatives ( $P = 0.0806$ , Kruskal-Wallis test). Deux épitopes minimaux de l'ARFP (SLVEFTCCRA et PVALGLAGA; voir ci-dessous) ont été testé en ELISpot, parce que les souris sont transgéniques pour le HLA-A\*0201 et ces épitopes sont restreints par cet allèle. Il n'y avait pas de production d'IFN-  $\gamma$  significative pour ces peptides et ce chez

tous le groupes. La production d'IL-4 par les splénocytes en réponse à une stimulation avec la rARFP n'a pas pu être déterminé dû au bruit de fond élevé (Figure 3.17A).

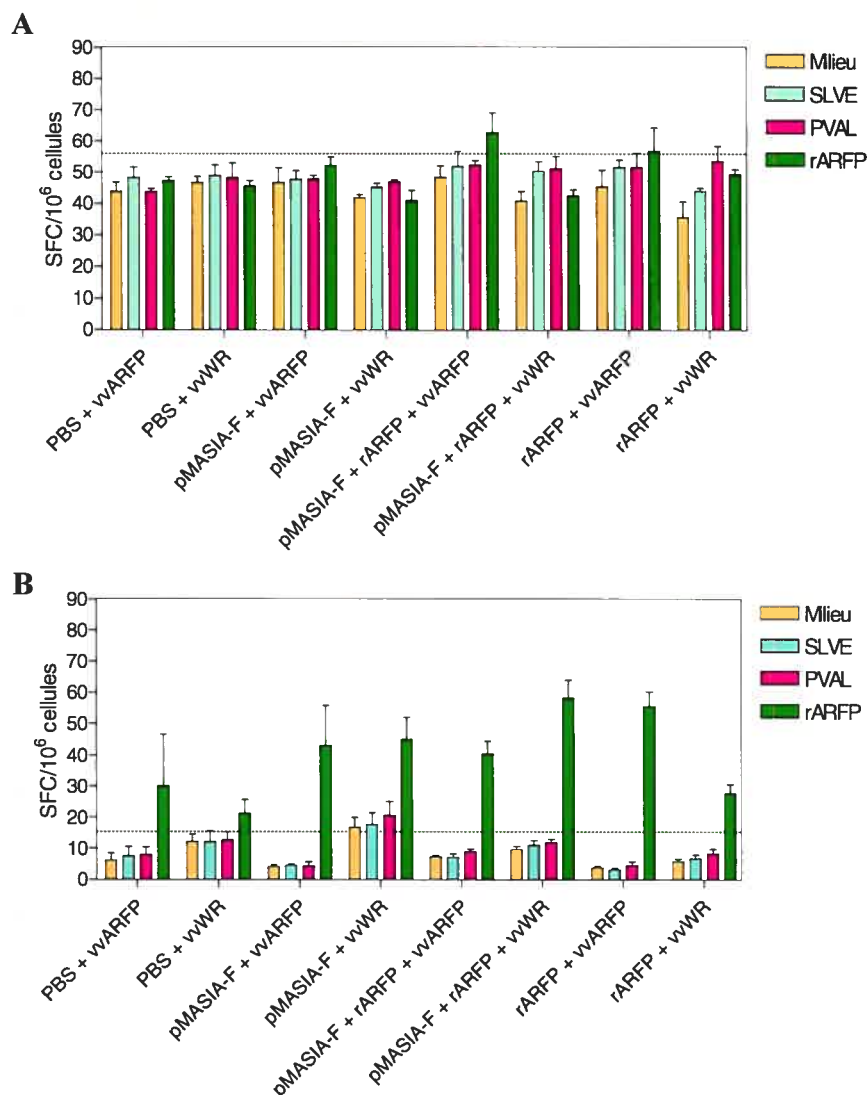
La capacité proliférative des splénocytes en réponse à une stimulation avec la rARFP ou les deux épitopes minimaux a été déterminée par un test de prolifération mesuré par l'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats montrent que les splénocytes souris immunisées (pMASIA-F ou rARFP) et infectées avec vvARFP ont proliféré beaucoup plus que ceux des souris immunisées et infectées avec vvWR (Figure 3.18). En fait, ce sont les seuls qui ont réussi à franchir le seuil de positivité dans ce test. De plus, les splénocytes des souris qui ont reçu les immunisations pMASIA-F avec un « boost » rARFP et qui ont ensuite été infectées avec le vvARFP ont proliféré plus (IS moyen de 17.39) que ceux des autres souris infectées avec le vvARFP et immunisées avec la rARFP seule (IS moyen de 11.62) ( $P = 0.0143$ , Mann-Whitney U test).

La charge virale ovarienne a été quantifiée par test de plaques. Chez les souris infectées par le vvARFP, il y a une souris dans chaque groupe chez laquelle il n'y a pas eu d'infection détectable, ce qui a réduit les groupes à 3 souris chaque. Nonobstant de ce fait, il y a une différence évidente entre la charge virale moyenne observée chez les souris non-immunisées et celle des souris immunisées (Figure 3.19A). Il faudra répéter cette expérience avec plus de souris dans chaque groupe ( $n=10$ ) afin de confirmer que ces différences sont statistiquement significatives.



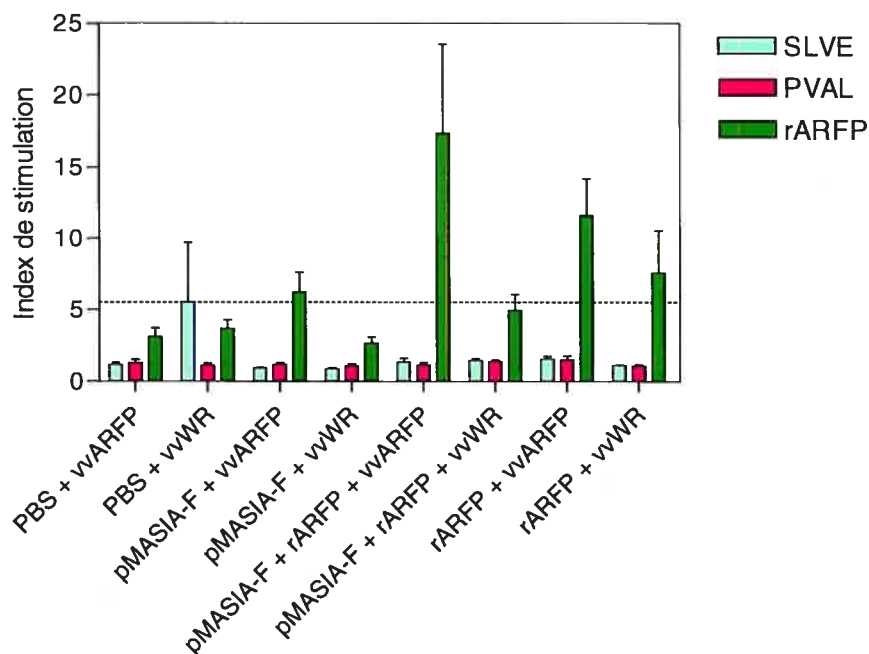
**Figure 3.16 : Titres d'anticorps anti-ARFP chez les souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1. Protocole 7.**

Les souris ont été immunisées avec pMASIA-F, la rARFP ou pMASIA-F avec un boost rARFP et infectées avec le *vaccinia* ARFP-recombinant (vvARFP) ou de type sauvage (vvWR).



**Figure 3.17 : Production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1. Protocole 7.**

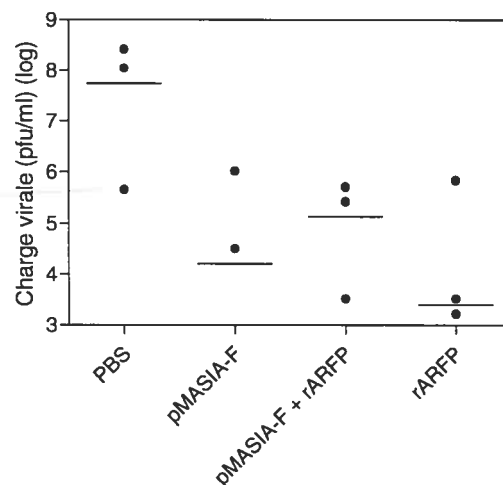
A) Production d'IL-4 après stimulation avec du milieu AIM-V, la rARFP, SLVEFTCCR ou PVALGLAGA. B) Production d'IFN- $\gamma$  après stimulation avec du milieu AIM-V, la rARFP, SLVEFTCRA ou PVALGLAGA. Les souris ont été immunisées avec pMASIA-F, la rARFP ou pMASIA-F avec un boost rARFP et infectées avec le *vaccinia* ARFP-recombinant (vvARFP) ou de type sauvage (vvWR). Production de cytokines déterminée par ELISpot. Le seuil de positivité est établi en prenant la valeur de la densité optique moyenne des souris PBS stimulées avec le milieu seul, plus deux fois l'écart type.



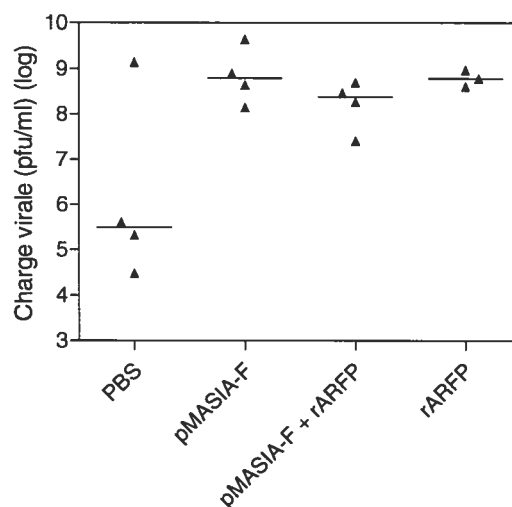
**Figure 3.18: Prolifération des splénocytes des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1. Protocole 7.**

Souris immunisées et infectées avec le *vaccinia* ARFP-recombinant (vvARFP) ou de type sauvage (vvWR). PVAL correspond à l'épitope minimal PVALGLAGA et SLVE correspond à l'épitope minimal SLVEFTCCRA. Prolifération cellulaire déterminée par incorporation de thymidine tritiée. Le seuil de positivité est établi en prenant la valeur de la densité optique moyenne des souris PBS stimulées avec le milieu seul, plus deux fois l'écart type.

**A** Charge virale des souris challengées avec vvARFP.  
Protocole 7.



**B** Charge virale des souris challengées avec vvWR.  
Protocole 7.



**Figure 3.19: Protection des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201/HLA-DR1 contre une infection avec le *vaccinia*. Protocole 7.**

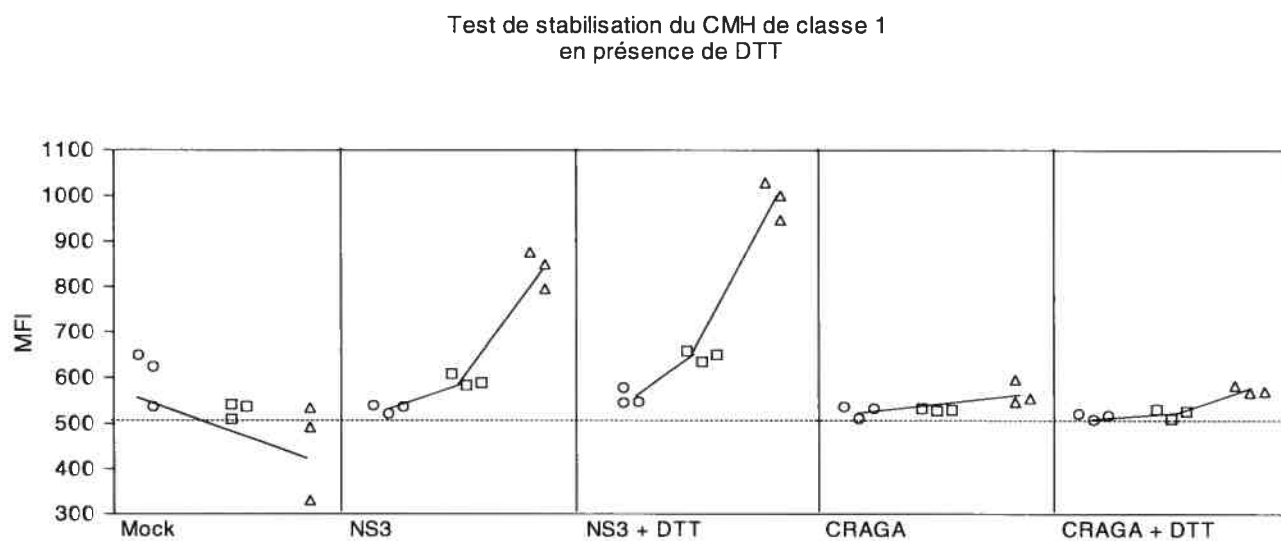
A) Souris immunisées, infectées avec le vvARFP. Contrôle : souris immunisées avec du PBS. B) Souris immunisées, infectées avec vvWR. Contrôle : souris immunisées avec PBS.

### 3.10. Identification d'épitopes minimaux restreints par HLA-A2

Un panel de 37 peptides (15-mers chevauchants), basés sur la séquence complète de l'ARFP du VHC de génotype 1a, a été utilisé dans un test de stabilisation du CMH de classe I pour voir si certains de ces peptides étaient capables d'interagir de manière dose dépendante avec HLA-A\*0201. Du panel initial, trois peptides ont répondu d'une façon dose dépendante : F29-43 (VRSLVEFTCCRAGAL), F37-51 (CCRAGALDWVCARRE) et F101-115 (PVALGLAGAPQTPGV) (Troesch et al., 2005). Ces séquences ont été analysées au moyen des algorithmes Bimas et SYFPEITHI afin d'évaluer la probabilité de la présence d'épitopes minimaux (nonamères ou decamères). Les peptides ayant obtenu les plus hauts scores ont été synthétisés et testés, mais seulement un d'eux a réussi à stabiliser le CMH de classe I de manière dose-dépendante : SLVEFTCCRA (Troesch et al., 2005). L'antioxydant (dithiothreitol) DTT a été rajouté au HBSS et au DMSO pour dissoudre les peptides, puisque il est décrit que cela prévient la formation de liens disulfures entre les résidus de cystéine (Peptide Handling Guide, Sigma Aldrich). Quoique cela n'a pas augmenté la réponse dose dépendante du peptide CCRAGALDWVCARRE (Figure 3.20), il a été conclu de l'ajouté au mélange dans tous les cas. D'autre analogues ont été synthétisés en se basant encore sur les score SYFPEITHI et Bimas (Figure 3.21) et les algorithmes SVMHC (Dönnes et Elofsson, 2002) et EpiJen (Doytchinova et al., 2006) ainsi que la conservation de leur séquence nucléotidique parmi les isolats de VHC disponibles (Annexe 4) et analysés de la même façon. Le seul qui a démontré être capable de stabiliser le CMH d'une manière dose-dépendante est PVALGLAGA (Figure 3.22). Les résultats indiquent qu'il y a deux

épitopes LTC minimaux dans la séquence de l'ARFP, l'un d'eux n'ayant jamais été décrit auparavant.





**Figure 3.20 : Test de liaison peptidique pour déterminer l'effet du DTT.**

Test de stabilisation du CMH de classe 1 pour voir si le DTT augmente l'affinité pour le CMH de classe I des peptides contenant des résidus cystéine. Cercles : 20 µg/ml; carrés : 100 µg/ml, triangles : 200 µg/ml.

**Peptide CCRAGALDWVCARRE**

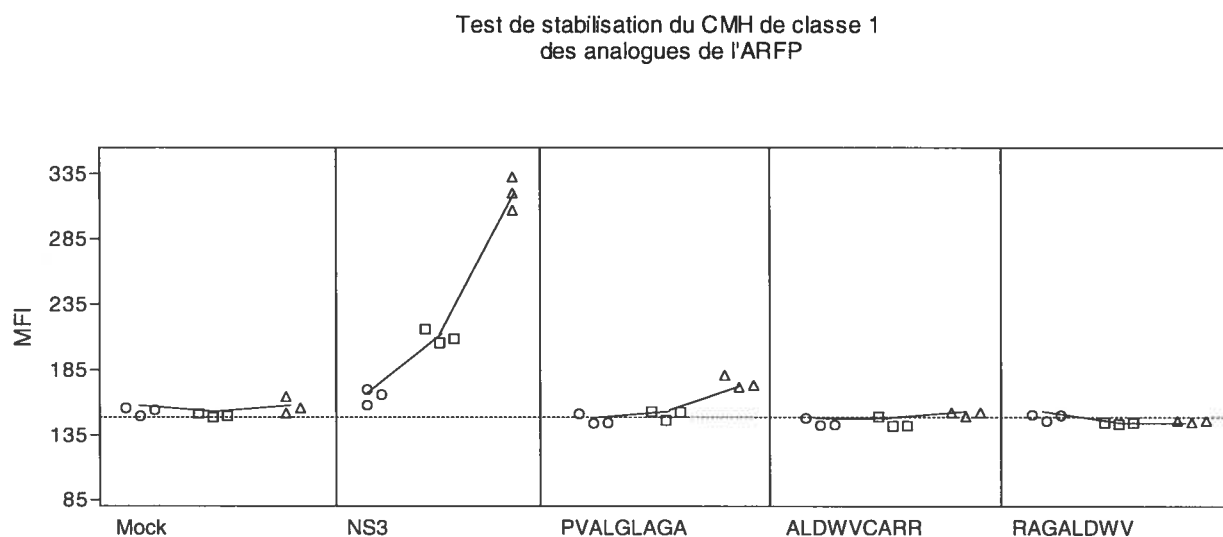
<b>Analogue</b>	<b>Bimas t1/2</b>	<b>SYFPEITHI</b>
CRAGALDWV	0.060	18
CCRAGALDW	0.608	14
RAGALDWVC	0.212	5
ALDWVCARR	0.006	14

**Peptide PVALGLAGAPQTPGV**

<b>Analogue</b>	<b>Bimas t1/2</b>	<b>SYFPEITHI</b>
ALGLAGAPQT	7,452	17
GLAGAPTQTP	0,015	17
PVALGLAGA	0,022	16
AGAPQTPGV	0,454	20
LAGAPQTPGV	1,642	18

**Figure 3.21 : Analogues de peptides.**

Séquences des analogues testés par le test de stabilisation du CHM de classe I dans la lignée cellulaire T2. En rouge, le seul analogue testé qui est un épitope minimal possible de l'ARFP.



**Figure 3.22 : Cartographie des analogues ARFP additionnels.**

Test de stabilisation du CMH de classe I pour trois des analogues (9-mers) synthétisés à partir de la séquence de 15-mers qui ont répondu d'une manière dose dépendante au même test. Cercles: 20 µg/ml; carrés : 100 µg/ml, triangles : 200 µg/ml.

## **Chapitre IV : Discussion**

## 1. Récapitulation

L'objectif de ce projet était d'étudier les réponses immunitaires induites par l'ARFP chez la souris dans le but de développer un vaccin prophylactique ou thérapeutique. Pour ce faire, trois différentes approches expérimentales ont été poursuivies. La première est basée sur l'utilisation de la rARFP comme immunogène chez la souris C57Bl/6. La deuxième fait appel à vaccin à ADN chez la souris DBA/2 tg HLA-A2/DR1. La troisième concerne l'identification d'épitopes minimaux dans la séquence de l'ARFP à l'aide d'un panel de peptides chevauchants.

## 2. Vaccin protéique

Le vaccin protéique a été évalué en quantifiant les réponses humorales et cellulaires induites par l'administration de la rARFP, ainsi qu'en mesurant de la charge virale suivant un challenge avec un virus de la vaccine exprimant l'ARFP (vvARFP). Il a été démontré que l'immunisation avec l'ARFP menait à une robuste production d'anticorps anti-ARFP, et que le titre de ces anticorps était maintenu durant les trois à six semaines suivant la dernière immunisation. L'isotypage des anticorps prélevé lors du dernier échantillonnage indique une réponse de type Th1 (présence d'anticorps IgG2a) mais aussi de type Th2 (présence d'anticorps IgG1). Ces données ont été confirmées par la présence de cytokines de type Th1 (IFN- $\gamma$ ) et Th2 (IL-4) à des niveaux plus élevés pour les souris immunisées que chez les souris contrôles (souris PBS) par le test ELISpot. En outre, les souris immunisées avec la rARFP et infectées avec le vvARFP ont monté des niveaux de production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 supérieurs aux niveaux produits par les souris immunisées avec la rARFP et infectées avec le vvWR ou du PBS. Ceci indique

que la réponse observée chez ces souris est bien spécifique pour l'ARFP, et n'est pas due à une action non spécifique induite par l'infection virale. Le fait que la rARFP soit capable d'induire des réponses d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  est d'un grand intérêt, puisque la réponse immunitaire suite à des immunisations avec une protéine est souvent biaisée vers un profil de type Th2.

Des études plus approfondies seront nécessaires pour quantifier de manière plus précise la réponse cellulaire, puisque l'ELIspot n'a donné de résultats concluants que dans le protocole quatre, dû à nombre insuffisant de cellules pour chaque souris (<250 000) lors des autres protocoles (2 et 3). Une façon d'optimiser la technique, serait de mettre les cellules en plaques pour l'ELIspot immédiatement après leur isolation. Les protocoles de vaccination protéique ont été conduits dans le laboratoire du Dr. Denis Leclerc au CHUL à Québec et les splenocytes isolés ont dû être congelés lors de leur expédition; ce qui a eu un impact certain sur le recouvrement de cellules et, en conséquence, a limité leur utilité pour les essais ELIspot.

À l'aide de test de plaques, il a été démontré que pour le protocole 3, le vaccin réduit de manière significative (Mann-Whitney U test) la charge virale des souris immunisées en comparaison avec les souris non-immunisées suivant un challenge avec un virus de la vaccine recombinant pour l'ARFP ( $P = 0,0159$ ). Cependant, pour le protocole 4 la charge virale des souris immunisées et infectées avec le vvARFP n'est pas réduite de manière statistiquement significative ( $P = 0.4524$ ). Quand les résultats des protocoles 3 et 4 sont combinés, la charge virale des souris immunisées avec la rARFP et infectées avec le vvARFP est nettement plus faible, mais n'est pas significatif à  $P < 0.05$  ( $P = 0.0807$ ). Par contre il y a un grand écart entre les charges virales des souris

immunisées et infectées avec le vvARFP dans le quatrième protocole, tandis que les souris non-immunisées ont une charge virale plutôt constante (Figure 3.8). Ceci laisse suggérer une immunisation non efficace de certaines souris. Une purification de la protéine résultant dans l'agrégation de la protéine pourrait être responsable pour cette différence.

Pour pouvoir utiliser les résultats de PCR quantitatif il faudrait faire une courbe standard avec une étendue plus large pour pouvoir quantifier de plus petites concentrations d'ADN et déterminer la raison de la différence des résultats obtenus par qPCR versus ceux obtenus par test de plaques. Une qPCR en temps réelle serait probablement plus spécifique.

### **3. Vaccin à ADN**

La plateforme de vaccination avec le vecteur ADN a été divisée en trois étapes pour évaluer premièrement la performance de différents vecteur contenant l'insert codant pour l'ARFP, et deuxièmement l'efficacité du vecteur choisi d'induire une réponse immunitaire de type Th1/Th2 chez des souris DBA/2 double transgéniques pour les molécules HLA-A2 et HLA-DR1, en comparaison avec le vecteur administré avec un « boost » protéique rARFP ou avec la rARFP seule. La troisième étape a servi pour évaluer la capacité du vecteur à protéger dans le contexte d'une infection avec le vaccinia recombinant pour l'ARFP.

Le vecteur pMASIA-F a été sélectionné pour sa capacité d'induire des réponses cellulaires (quantifiées par ELISpot) et des réponses humorales (ELISA), quoi que celles-ci fussent très faibles. Les étapes subséquentes ont révélées que le pMASIA-F administré avec un « boost » protéique est plus efficace que le vecteur seul et, que la rARFP est plus

efficace pour l'induction de réponses humorales et cellulaires que le pMASIA-F seul ou le pMASIA-F avec un « boost » protéique.

La troisième étape de cette plateforme (protocole 7) a révélé que les souris immunisées (pMASIA-F, pMASIA-F + rARFP, rARFP) et infectées avec le vvARFP ont des titres d'anticorps IgG plus élevés que les souris immunisées et infectées avec le vvWR.

Les résultats des essais ELIsot et de prolifération en présence de thymidine tritiée pour le protocole 7 démontrent que la rARFP administré seule ou en boost dans un régime d'immunisations avec le vecteur pMASIA-F, stimule de manière efficace la prolifération des splénocytes et des réponses cellulaires (production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ ). De plus, en règle générale, les souris immunisées et infectées avec le vvARFP montent des réponses plus robustes que les souris immunisées et infectées avec le vvWR. Indiquant, tous comme les résultats d'ELISA pour ce protocole, que la production d'une réponse immunitaire (cellulaire ou humorale) est en fait spécifique pour l'antigène contre laquelle les souris ont été immunisées.

Les tests de plaques révèlent que la tendance de la rARFP de diminuer la charge virale des souris immunisées *versus* celle qui ne le sont pas, est semblable aux protocoles d'immunisation protéiques. Dans chaque groupe de souris ( $n = 4$ ) il y en avait seulement 3 qui ont été infectées de manière productive par le vvARFP, réduisant la taille de l'échantillon. C'est pour cette raison que les différences de moyennes ne sont pas significatives entre les groupes. Par contre, il est clair que la charge virale est diminuée chez les souris immunisées.



Pour justifier l'utilisation du vecteur ADN versus une protéine recombinante il faudrait démontrer la supériorité de ce véhicule à induire des réponses cellulaires ainsi que humorales, ce qui n'a pas encore été fait. Par contre, l'essai de prolifération en présence de thymidine tritiée a révélé que les splénocytes des souris immunisées avec le pMASIA-F en conjonction avec un « boost » protéique proliféraient plus quand elles sont stimulées avec la rARFP que les souris immunisées avec la protéine seule. Ce taux de prolifération plus élevé pourrait contribuer à une plus grande expansion de cellules T, qui ensuite pourrait contribuer à un meilleur contrôle de la virémie.

De plus, il aurait été utile d'inclure des groupes immunisés sans les ODN CpG pour pouvoir valider l'utilisation de ceux-ci en tant qu'adjuvant.

#### **4. Épitopes minimaux**

Au cours des études menées au sein de notre équipe, trois nouveaux épitopes CTL potentiels (15-mères) ainsi que deux épitopes minimaux (nonamères) ont été dérivé à partir de la séquence complète du VHC de génotype 1a à l'aide de test de stabilisation du CMH de classe 1. Les trois peptides (VRSLVEFTCCRAGAL, CCRAGALDWVCARRE et PVALGLAGAPQTPGV) et un des épitopes minimaux (SLVEFTCCR) ont été dérivé par Troesch et. al., tandis que PVALGLAGA correspond a un nouvel épitope qui n'a pas encore été décrit. La découverte d'épitopes LTC restreints par HLA-A2 est un facteur important pour l'inclusion de l'ARFP dans un vaccin potentiel anti-VHC multivalent puisque cela contribuerait à augmenter le spectre de reconnaissance antigénique de la réponse initiale du système immunitaire envers le VHC en ciblant des épitopes multiples. Une réponse multi-spécifique est associée au contrôle de la réplication virale ainsi qu'à la résolution de l'infection. Une prochaine étape pourrait être d'essayer l'utilisation de

différents analogues de ces peptides minimaux pour tenter d'augmenter leur immunogénicité.

Les deux épitopes minimaux ont été essayé en ELIspot et en test de prolifération à l'aide des splénocytes des souris du protocole 7 (vaccin ADN avec challenge *vaccinia*). Ces deux peptides n'ont pas provoqué la production d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-4, ou même de prolifération. Cependant, ces essais ont été conduits avec des splénocytes totaux, et il se peut que l'influence des peptides n'ait pas pu être observée dû au petit nombre de cellules capable de reconnaître les peptides dans un contexte HLA-A2 restreints. Une meilleure façon d'observer l'effet de ces peptides serait d'utiliser un tétramère capable de les présenter, pour ensuite isoler les splénocytes tétramère-positifs et détecter la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 par un marquage intracellulaire. Il serait ainsi plus facile de voir l'effet de ces peptides sur la population de cellules que nous ciblons (HLA-A2 positives).

## 5. Directions futures

Prises d'une manière collective, les résultats des deux plateformes de vaccination expérimentale nous indiquent que l'ARFP est une immunogène efficace, capable de stimuler une réponse humorale ainsi que cellulaire. Étant donné la variation observée dans les résultats (isotypes d'anticorps et charges virales différents dans les protocoles 3 et 4) il serait recommandé de refaire une autre répétition du vaccin protéique sous les mêmes conditions pour pouvoir en venir à une conclusion définitive.

Il serait également intéressant d'étudier la réponse IgG des souris des protocoles 1 à 4 pour déterminer si les titres d'anticorps des souris immunisées avec l'ARFP et infectées avec le vvARFP ont une cinétique de réponse similaire aux souris du protocole 7.

Une perspective pour le projet serait de trouver une plateforme vaccinale existante dans laquelle l'ARFP pourrait être incorporée. Puisque la fonction de l'ARFP et son importance clinique n'ont pas encore été élucidées, il serait un peu prématuré de vouloir l'utiliser seul en tant que vaccin prophylactique. Il serait plus avantageux de l'inclure dans un vaccin multivalent qui incorpore les glycoprotéines (E1 et E2) et peut-être même la protéine de la capside (core) pour mettre plus de chances sur le côté de l'immunité neutralisante ou au moins suffisante pour empêcher l'établissement d'un état d'infection chronique.

Puisque le vaccin ADN que nous avons utilisé (pMASIA-F) n'élicitait pas des réponses immunitaires très encourageantes, d'autres vecteurs pourraient être essayés avec une variété de molécules immunomodulatrices pour voir si la réponse immunitaire peut être augmentée. Parmi les autres plateformes vaccinales existantes, l'ARFP pourrait être incluse dans un vecteur MVA, un autre poxvirus, un vecteur codant pour des cytokines ou seule avec un adjuvant expérimental (protéosome, micro-particules, cytokines). Puisque deux épitopes minimaux ont été dérivés, ils pourraient être inclus dans un vaccin peptidique.

Même avec des avancées importantes dans le développement de thérapies pour traiter les personnes atteintes du VHC, il reste que l'accès à ces traitements est très coûteux et est souvent limité dans les régions qui pourraient en bénéficier le plus. Un vaccin prophylactique ou thérapeutique pourrait alléger le fardeau que ce virus impose sur les systèmes de santé et aussi diminuer le réservoir pour prévenir des infections futures.

## **CONCLUSIONS**

- La rARFP est un immunogène efficace qui induit de fortes réponses humores ainsi que cellulaires chez la souris C57Bl/6 quand elle est administrée avec l'adjuvant incomplet de Freund.
- L'inoculation avec la rARFP et/ou le vecteur pMASIA-F confère un certain degré de protection contre un challenge avec un virus de la vaccine recombinant pour l'ARFP (vvARFP) chez des souris C57Bl/6 et DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201 et HLA-DR1.
- Le vecteur à ADN pMASIA-F inoculé avec un « boost » protéique chez des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201 et HLA-DR1 donne une meilleure réponse immunitaire (humorale et cellulaire) que le vecteur pMASIA-F seul.
- Des souris DBA/2 transgéniques pour HLA-A\*0201 et HLA-DR1 inoculées avec la rARFP montent des réponses humores et cellulaire (production d'IL4, d'IFN- $\gamma$  et prolifération) supérieures aux souris inoculées avec pMASIA-F seul ou avec le « boost » protéique.
- La rARFP induit des réponses de type Th1 et de type Th2.
- Les épitopes SLVEFTCCRA et PVALGLAGA correspondent à deux nouveaux épitopes HLA-A2 restreints. Ces épitopes sont potentiellement ciblés par des lymphocytes T cytotoxiques (LTC).

## **BIBLIOGRAPHIE**

NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consensus State Sci Statements 19(3), 1-46.

Abraham, J.-D., Himoudi, N., Kien, F., Berland, J.-L., Codran, A., Bartosch, B., Baumert, T., Paranhos-Baccala, G., Schuster, C., Inchauspe, G., and Kieny, M. P. (2004). Comparative immunogenicity analysis of modified vaccinia Ankara vectors expressing native or modified forms of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *Vaccine* 22(29-30), 3917-3928.

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q.-X. (1999). Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *PNAS* 96(22), 12766-12771.

Alter, M.J. (1997). Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26(S3), 62S-65S.

Appel, N., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2005). Mutational Analysis of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A: Potential Role of Differential Phosphorylation in RNA Replication and Identification of a Genetically Flexible Domain. *J. Virol.* 79(5), 3187-3194.

Bain, C., Parroche, P., Lavergne, J. P., Duverger, B., Vieux, C., Dubois, V., Komurian-Pradel, F., Trepo, C., Gebuhrer, L., Paranhos-Baccala, G., Penin, F., and Inchauspe, G. (2004). Memory T-Cell-Mediated Immune Responses Specific to an Alternative Core Protein in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 78(19), 10460-10469.

Balasubramanian, A., Munshi, N., Koziel, M. J., Hu, Z., Liang, T. J., Groopman, J. E., and Ganju, R. K. (2005). Structural proteins of Hepatitis C virus induce interleukin 8 production and apoptosis in human endothelial cells. *J Gen Virol.* 86(12), 3291-3301.

Balogun, M., Laurichesse, H., Ramsay, ME, Sellwood, J, Westmoreland, D, Paver, WK, Pugh, SF, Zuckerman, M, Pillay, D, Wreghitt, T. (2003). Risk factors, clinical features and genotype distribution of diagnosed hepatitis C virus infections: a pilot for a sentinel laboratory-based surveillance. *Commun Dis Public Health* 6(1), 34-9.

Baril, M., and Brakier-Gingras, L. (2005). Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucl. Acids Res.* 33(5), 1474-1486.

Barth, H., Liang, T., and Baumert, T. (2006). Hepatitis C virus entry: Molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 44(3), 527-535.

Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and Cosset, F.-L. (2003a). Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *J. Biol. Chem.* 278(43), 41624-41630.

Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003b). Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. *J. Exp. Med.* 197(5), 633-642.

- Bartosch, B., and Cosset, F.-L. (2006). Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348(1), 1-12.
- Basu, A., Steele, R., Ray, R., and Ray, R. B. (2004). Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 85(8), 2299-2306.
- Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T., and Liang, T. J. (1998). Hepatitis C Virus Structural Proteins Assemble into Viruslike Particles in Insect Cells. *J. Virol.* 72(5), 3827-3836.
- Bigger, C. B., Brasky, K. M., and Lanford, R. E. (2001). DNA Microarray Analysis of Chimpanzee Liver during Acute Resolving Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 75(15), 7059-7066.
- Blackard, J.T., Kemmer, N., and Sherman, K. (2006). Extrahepatic replication of HCV: Insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 44(1), 15-22.
- Boni, S., Lavergne, J.-P., Boulant, S., and Cahour, A. (2005). Hepatitis C Virus Core Protein Acts as a trans-Modulating Factor on Internal Translation Initiation of the Viral RNA. *J. Biol. Chem.* 280(18), 17737-17748.
- Boulant, S., Becchi, M., Penin, F., and Lavergne, J.-P. (2003). Unusual Multiple Recoding Events Leading to Alternative Forms of Hepatitis C Virus Core Protein from Genotype 1b. *J. Biol. Chem.* 278(46), 45785-45792.
- Bowen, D. G., and Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436(7053), 946-952.
- Brass, V., Moradpour, D., and Blum, H. (2006). Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *Int J Med Sci.* 3, 29-34.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S., Stura, E., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F., and Rey, F. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 23(4), 728-38.
- Buller, R., Smith, G., Cremer, K., Notkins, A., and Moss, B. (1985). Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* 317(6040), 813-5.
- Capone, S., Meola, A., Ercole, B. B., Vitelli, A., Pezzanera, M., Ruggeri, L., Davies, M. E., Tafi, R., Santini, C., Luzzago, A., Fu, T.-M., Bett, A., Colloca, S., Cortese, R., Nicosia, A., and Folgori, A. (2006). A Novel Adenovirus Type 6 (Ad6)-Based Hepatitis C Virus Vector That Overcomes Preexisting Anti-Ad5 Immunity and Induces Potent and Broad Cellular Immune Responses in Rhesus Macaques. *J. Virol.* 80(4), 1688-1699.
- Chen, S.L., and Morgan, T. (2006). The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci.* 3, 47-52.



Choi, J., Xu, Z., and Ou, J.-h. (2003). Triple Decoding of Hepatitis C Virus RNA by Programmed Translational Frameshifting. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1489-1497.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A., Overby, L., Bradley, D., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244(4902), 359-62.

Choo, Q.L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K., Kuo, C., Kansopon, J., McFarland, J., Tabrizi, A., Ching, K., Moss, B., Cummins, L., Houghton, M., and Muchmore, E. (1994). Vaccination of Chimpanzees Against Infection by the Hepatitis C Virus. *PNAS* 91(4), 1294-1298.

Chu, R.S., Targonis, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V., Harding, C.V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.* 186(10), 1623-1631.

Cooper, S., Erickson, A.L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D.Y., Houghton, M., Parham, P., and Walker, C. M. (1999). Analysis of a Successful Immune Response against Hepatitis C Virus. *Immunity* 10(4), 439-449.

Cormier, E. G., Durso, R. J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W. C., Gardner, J. P., and Dragic, T. (2004). L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *PNAS* 101(39), 14067-14072.

Cornberg, M., Hüppe, D., Wiegand, J., Felten, G., Wedemeyer, H., and Manns, M. P. (2003). Treatment of Chronic Hepatitis C with PEG-Interferon alpha-2b and Ribavirin: 24 Weeks of Therapy are Sufficient for HCV Genotype 2 and 3. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 41(6), 517-522.

Cristina, J., Lopez, F., Moratorio, G., Lopez, L., Vasquez, S., Garcia-Aguirre, L., and Chunga, A. (2005). Hepatitis C virus F protein sequence reveals a lack of functional constraints and a variable pattern of amino acid substitution. *J Gen Virol.* 86(1), 115-120.

Crumpacker, D., Alexander, J., Cresswell, P., and Engelhard, V. (1992). Role of endogenous peptides in murine allogenic cytotoxic T cell responses assessed using transfectants of the antigen-processing mutant 174xCEM.T2. *J Immunol* 148(10), 3004-3011.

Dal Molin, G., D'Agaro, P., Ansaldi, F., Ciana, G., Fertz, C., Alberico, S., and Campello, C. (2002). Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: Rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. *Journal of Medical Virology* 67(2), 137-142.

Dalgard, O., Jeansson, S, Skaug, K, Raknerud, N, Bell, H. (2003). Hepatitis C in the general adult population of Oslo: prevalence and clinical spectrum. *Scand J Gastroenterol.* 38(8), 864-70.

De Francesco, R., Tomei, L., Altamura, S., Summa, V., and Migliaccio, G. (2003). Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 58(1), 1-16.

Deinhardt, F., Holmes, A. W., Capps, R. B., and Popper, H. (1967). Studies on the Transmission of Human Viral Hepatitis to Marmoset Monkeys: I. Transmission of Disease, Serial Passages, and Description of Liver Lesions. *J. Exp. Med.* 125(4), 673-688.

Denis, J., Majeau, N., Acosta-Ramirez, E., Savard, C., Bedard, M.-C., Simard, S., Lecours, K., Bolduc, M., Pare, C., Willems, B., Shoukry, N., Tessier, P., Lacasse, P., Lamarre, A., Lapointe, R., Lopez Macias, C., and Leclerc, D. (2007). Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology* In Press, Corrected Proof.

Donnes, P., and Elofsson, A. (2002). Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC. *BMC Bioinformatics* 3(1), 25.

Doytchinova, I., Guan, P., and Flower, D. (2006). EpiJen: a server for multistep T cell epitope prediction. *BMC Bioinformatics* 7(1), 131.

Dustin, L. B., and Rice, C. M. (2007). Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C. *Annual Review of Immunology* 25(1), 71-99.

Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.* 76(12), 5974-5984.

Evans, M. J., Rice, C. M., and Goff, S. P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *PNAS* 101(35), 13038-13043.

Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., and Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446(7137), 801-805.

Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzera, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J., and Purcell, R. H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *PNAS* 93(26), 15394-15399.

Finkelman, F., Katona, I., Mosmann, T., and Coffman, R. (1988). IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol* 140(4), 1022-1027.

Finkelman, F. D., Holmes, J., Katona, I. M., Urban, J. F., Beckmann, M. P., Park, L. S., Schooley, K. A., Coffman, R. L., Mosmann, T. R., and Paul, W. E. (1990). Lymphokine Control of in Vivo Immunoglobulin Isotype Selection. *Annual Review of Immunology* 8(1), 303-333.

- Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J., Lavergne, J., Paranhos-Baccala, G., Inchauspe, G., and Bain, C. (2007). Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol.* 88(4), 1149-1162.
- Fournillier, A., Dupeyrot, P., Martin, P., Parroche, P., Pajot, A., Chatel, L., Fatmi, A., Gerossier, E., Bain, C., Lone, Y. C., Trepo, C., and Inchauspe, G. (2006). Primary and memory T cell responses induced by hepatitis C virus multiepitope long peptides. *Vaccine* 24(16), 3153-3164.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y.-M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., and Gale, M., Jr. (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *PNAS* 102(8), 2986-2991.
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., Khoby, T. E., Abdel-Wahab, Y., Ohn, E. S. A., Anwar, W., and Sallam, I. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *The Lancet* 355(9207), 887-891.
- Gerlach, J., Diepolder, HM, Jung, MC, Gruener, NH, Schraut, WW, Zachoval, R, Hoffmann, R, Schirren, CA, Santantonio, T, Pape, GR. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117(4).
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J. Virol.* 77(9), 5487-5492.
- Goutagny, N., Fatmi, A., De Ledinghen, V., Penin, F., Couzigou, P., Inchauspe, G., and Bain, C. (2003). Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 187(12), 1951-8.
- Griffin, S. D. C., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. G., and Rowlands, D. J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Letters* 535(1-3), 34-38.
- Guidotti, L. G., and Chisari, F. V. (2001). Noncytolytic Control of Viral Infections by the Innate and Adaptive Immune Response. *Annual Review of Immunology* 19(1), 65-91.
- Hauri, A. M., Armstrong, G. L., and Hutin, Y. J. F. (2004). The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *International Journal of STD & AIDS* 15(1), 7-16.
- Houghton, M., and Abrignani, S. (2005). Prospects for a vaccine against hepatitis C virus. *Nature* 436(7053), 961-966.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *PNAS* 100(12), 7271-7276.

Huang, Z., Murray, M. G., and Secrist III, J. A. (2006). Recent development of therapeutics for chronic HCV infection. *Antiviral Research Special Issue To Honour Professor Erik De Clercq* 71(2-3), 351-362.

Hugle, T., Fehrman, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H., Rice, C., Blum, H., and Moradpour, D. (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284(1), 70-81.

ICTVdb. The Universal Virus Database, version 3.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>

InterMune, communiqué de presse, 2006-10-30. InterMune Presents at Two Liver Disease Conferences Research on ITMN-191 in Hepatitis C.

Jeong, S.-H., Qiao, M., Nascimbeni, M., Hu, Z., Rehmann, B., Murthy, K., and Liang, T. J. (2004). Immunization with Hepatitis C Virus-Like Particles Induces Humoral and Cellular Immune Responses in Nonhuman Primates. *J. Virol.* 78(13), 6995-7003.

Kalkeri, G., Khalap, N., Garry, R. F., Fermin, C. D., and Dash, S. (2001). Hepatitis C Virus Protein Expression Induces Apoptosis in HepG2 Cells. *Virology* 282(1), 26-37.

Kanda, T., Basu, A., Steele, R., Wakita, T., Ryerse, J. S., Ray, R., and Ray, R. B. (2006). Generation of Infectious Hepatitis C Virus in Immortalized Human Hepatocytes. *J. Virol.* 80(9), 4633-4639.

Kanto, T., and Hayashi, N. (2006). Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med.* 45(4), 183-91.

Karupiah, G., Coupar, B., Ramshaw, I., Boyle, D., Blanden, R., and Andrew, M. (1990). Vaccinia virus-mediated damage of murine ovaries and protection by virus-expressed interleukin-2. *Immunol Cell Biol.* 68(Pt. 5), 325-33.

Kato, N., Ootsuyama, Y., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Sekiya, H., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1992). Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189(1), 119-127.

Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., Krieg, A. M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *PNAS* 93(7), 2879-2883.

Klinman, D. M., Yamshchikov, G., Ishigatsubo, Y. (1997). Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 158(8), 3635-3639.

Klinman, D. M., Xie, H., Little, S. F., Currie, D., and Ivins, B. E. (2004). CpG oligonucleotides improve the protective immune response induced by the anthrax vaccination of rhesus macaques. *Vaccine* 22(21-22), 2881-2886.

Komurian-Pradel, F., Rajoharison, A., Berland, J., Khouri, V., Perret, M., van Roosmalen, M., Pol, S., Negro, F., and Paranhos-Baccalà, G. (2004). Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40(4), 900-909.

Lauer, G. M., Barnes, E., Lucas, M., Timm, J., Ouchi, K., Kim, A. Y., Day, C. L., Robbins, G. K., Casson, D. R., Reiser, M., Dusheiko, G., Allen, T. M., Chung, R. T., Walker, B. D., and Klenerman, P. (2004). High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 127(3), 924-936.

Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.-L., Penin, F., and Pecheur, E.-I. (2006). Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate Low pH-dependent Membrane Fusion with Liposomes. *J. Biol. Chem.* 281(7), 3909-3917.

Lechmann, M., Murata, K., Satoi, J., Vergalla, J., Baumert, T., and Liang, T. (2001). Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 34(2), 417-423.

Lechner, F., Wong, D. K. H., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B. D. (2000). Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. *J. Exp. Med.* 191(9), 1499-1512.

Lerat, H., Honda, M., Beard, M. R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.-Y., Weinman, S. A., and Lemon, S. M. (2002). Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis c virus. *Gastroenterology* 122(2), 352-365.

Leroux-Roels, G., Depla, E., Hulstaert, F., Tobback, L., Dincq, S., Desmet, J., Desombere, I., and Maertens, G. (2004). A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: tolerability and immunogenicity in healthy volunteers. *Vaccine* 22(23-24), 3080-3086.

Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., and Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol.* 6(10), 937-943.

Levin, M. K., Gurjar, M., and Patel, S. S. (2005). A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nat Struct Mol Biol.* 12(5), 429-435.

Levrero, M. (2006). Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25(27), 3834-3847.

Li, K., Foy, E., Ferreón, J. C., Nakamura, M., Ferreón, A. C. M., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr., and Lemon, S. M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *PNAS* 102(8), 2992-2997.

Lin, C., Hwang, S., Chiou, S., Kuan, C., Chen, L., Lee, T., Lee, M., Lee, H., Hsu, P., and Tsai, S. (2003). The prevalence and risk factors analysis of serum antibody to hepatitis C virus in the elders in northeast Taiwan. *J Chin Med Assoc.* 66(2), 103-8.

Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2005). Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* 309(5734), 623-626.

Lohmann, V., Korner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* 285(5424), 110-113.

Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A., and Bartenschlager, R. (2001). Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *J. Virol.* 75(3), 1437-1449.

Lozach, P.-Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.-L., and Altmeyer, R. (2004). C-type Lectins L-SIGN and DC-SIGN Capture and Transmit Infectious Hepatitis C Virus Pseudotype Particles. *J. Biol. Chem.* 279(31), 32035-32045.

Major, M., Dahari, H., Mihalik, K., Puig, M., Rice, C., Neumann, A., and Feinstone, S. (2004). Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* 39(6), 1709-1720.

Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T., and Shimotohno, K. (1999). Hepatitis C Virus Core Protein Inhibits Fas- and Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Apoptosis via NF-kappa B Activation. *J. Virol.* 73(6), 4713-4720.

McMullan, L.K., Grakoui, A., Evans, M.J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A.D., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (2007). Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *PNAS* 104(8), 2879-84.

Mehta, S., Cox, A., Hoover, D., Wang, X.-H., Mao, Q., Ray, S., Strathdee, S., Vlahov, D., and Thomas, D. (2002). Protection against persistence of hepatitis C. *The Lancet* 359(9316), 1478-1483.

Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R. T., Tyrrell, D. L. J., and Kneteman, N. M. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med.* 7(8), 927-933.

Meunier, J.-C., Engle, R. E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S. U., Cosset, F.-L., Purcell, R. H., and Bukh, J. (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *PNAS* 102(12), 4560-4565.

Missale, G., Bertoni, R., Lamonaca, V., Valli, A., Massari, M., Mori, C., Rumi, M. G., Houghton, M., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1996). Different Clinical Behaviors of Acute Hepatitis C Virus

Infection Are Associated with Different Vigor of the Anti-viral Cell-mediated Immune Response. *J. Clin. Invest.* 98(3), 706-714.

Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med.* 4(9), 1065-1067.

Munz, C., Steinman, R. M., and Fujii, S.-i. (2005). Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *Exp. Med.* 202(2), 203-207.

Narjes, F., Koch, U., and Steinkuhler, C. (2003). Recent developments in the discovery of hepatitis C virus serine protease inhibitors -- towards a new class of antiviral agents?. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 12(2), 153-163.

Netski, D. M., Mosbrugger, T., Depla, E., Maertens, G., Ray, S. C., Hamilton, R. G., Roundtree, S., Thomas, D. L., McKeating, J., and Cox, A. (2005). Humoral Immune Response in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis.* 41(5), 667-675.

Nowicki, M., Laskus, T., Nikolopoulou, G., Radkowski, M., Wilkinson, J., Du, W., Rakela, J., and Kovacs, A. (2005). Presence of hepatitis C virus (HCV) RNA in the genital tracts of HCV/HIV-1-coinfected women. *J Infect Dis.* 192(9), 1557-65.

Ogata, S., Nagano-Fujii, M., Ku, Y., Yoon, S., and Hotta, H. (2002). Comparative Sequence Analysis of the Core Protein and Its Frameshift Product, the F Protein, of Hepatitis C Virus Subtype 1b Strains Obtained from Patients with and without Hepatocellular Carcinoma. *J. Clin. Microbiol.* 40(10), 3625-3630.

Ollis, D., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N., and Steitz, T. (1985). Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 313(6005), 762-6.

Ott, G., Barchfeld, G., Chernoff, D., Radhakrishnan, R., van Hoogevest, P., and Van Nest, G. (1995). MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm Biotechnol.* 6, 277-96.

Otten, G., Schaefer, M., Greer, C., Calderon-Cacia, M., Coit, D., Kazzaz, J., Medina-Selby, A., Selby, M., Singh, M., Ugozzoli, M., zur Megede, J., Barnett, S. W., O'Hagan, D., Donnelly, J., and Ulmer, J. (2003). Induction of Broad and Potent Anti-Human Immunodeficiency Virus Immune Responses in Rhesus Macaques by Priming with a DNA Vaccine and Boosting with Protein-Adsorbed Polylactide Coglycolide Microparticles. *J. Virol.* 77(10), 6087-6092.

Pajot, A., Michel, M., Fazilleau, N., Pancré, V., Auriault, C., Ojcius, D., Lemonnier, F., and Lone, Y. (2004). A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *European Journal of Immunology* 34(11), 3060-3069.

Palitzsch, K., Hottentrager, B., Schlottmann, K., Frick, E., Holstege, A., Scholmerich, J., and Jilg, W. (1999). Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 11(11), 1215-20.

Pancholi, P., Perkus, M., Tricoche, N., Liu, Q., and Prince, A. M. (2003). DNA Immunization with Hepatitis C Virus (HCV) Polycistronic Genes or Immunization by HCV DNA Priming-Recombinant Canarypox Virus Boosting Induces Immune Responses and Protection from Recombinant HCV-Vaccinia Virus Infection in HLA-A2.1-Transgenic Mice. *J. Virol.* 77(1), 382-390.

Pavlovic, D., Neville, D. C. A., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B., and Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *PNAS* 100(10), 6104-6108.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F., Moradpour, D., and Pawlotsky, J. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39(1), 5-19.

Perkus, M., Tartaglia, J., and Paoletti, E. (1995). Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and other infectious diseases. *J Leukoc Biol.* 58(1), 1-13.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* 282(5390), 938-941.

Polakos, N. K., Drane, D., Cox, J., Ng, P., Selby, M. J., Chien, D., O'Hagan, D. T., Houghton, M., and Paliard, X. (2001). Characterization of Hepatitis C Virus Core-Specific Immune Responses Primed in Rhesus Macaques by a Nonclassical ISCOM Vaccine. *J Immunol.* 166(5), 3589-3598.

Prescott, Harley, and Klein (2002). "Microbiology." 5 ed.

Puig, M., Mihalik, K., Tilton, J., Williams, O., Merchlinsky, M., Connors, M., Feinstone, S., and Major, M. (2006). CD4+ immune escape and subsequent T-cell failure following chimpanzee immunization against hepatitis C virus. *Hepatology* 44(3), 736-745.

Puro, V., Petrosillo, N., and Ippolito, G. (1995). Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control* 23(5), 273-7.

Qureshi, S. (2006). Hepatitis C virus - biology, host evasion strategies, and promising new therapies on the horizon. *Medicinal Research Reviews* 9999(9999), n/a.

Ray, R. B., Steele, R., Meyer, K., and Ray, R. (1997). Transcriptional Repression of p53 Promoter by Hepatitis C Virus Core Protein. *J. Biol. Chem.* 272(17), 10983-10986.

Ray, R. B., Steele, R., Meyer, K., and Ray, R. (1998). Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene* 208(2), 331-336.



Rehermann, B., Chang, K.-M., McHutchison, J. G., Kokka, R., Houghton, M., and Chisari, F. V. (1996). Quantitative Analysis of the Peripheral Blood Cytotoxic T Lymphocyte Response in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J. Clin. Invest.* 98(6), 1432-1440.

Reichelt, P., Schwarz, C., and Donzeau, M. (2006). Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. *Protein Expression and Purification* 46(2), 483-488.

Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375(6529), 291-298.

Roche, communiqué de presse. 2006-10-27. Roche Oral Polymerase Inhibitor R1626 Shows Strong Antiviral Activity in Chronic Hepatitis C Patients in Early Phase II Studies.

Rollier, C., Depla, E., Drexhage, J. A. R., Verschoor, E. J., Verstrepen, B. E., Fatmi, A., Brinster, C., Fournillier, A., Whelan, J. A., Whelan, M., Jacobs, D., Maertens, G., Inchauspe, G., and Heeney, J. L. (2004). Control of Heterologous Hepatitis C Virus Infection in Chimpanzees Is Associated with the Quality of Vaccine-Induced Peripheral T-Helper Immune Response. *J. Virol.* 78(1), 187-196.

Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuisson, J., and Wychowski, C. (2003). Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol.* 84(7), 1751-1759.

Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P., and Kohn, L. D. (2003). Role of the Asialoglycoprotein Receptor in Binding and Entry of Hepatitis C Virus Structural Proteins in Cultured Human Hepatocytes. *J. Virol.* 77(1), 546-559.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO* 21(19), 5017-25.

Seeff, L.B. (1999). Natural history of hepatitis C. *Am J Med.* 27(107 6B), 10S-15S.

Seeff, L. B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36(5B), s35-s46.

Serebrov, V., and Pyle, A. M. (2004). Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 430(6998), 476-480.

Schering-Plough, communiqué de presse. 2005-11-14. Schering-Plough's Oral HCV Protease Inhibitor Demonstrates Potent Antiviral Activity as Monotherapy and in Combination With PEG-INTRON(R) in Phase I Studies. Results Reported at American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Meeting. Large Phase II Combination Study Under Way.

Shepard, C. W., Finelli, L., and Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet Infectious Diseases* 5(9), 558-567.

Shoukry, N. H., Cawthon, A. G., and Walker, C. M. (2004). Cell-Mediated Immunity and the Outcome of Hepatitis C Virus Infection. *Annual Review of Microbiology* 58(1), 391-424.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D., Okamoto, H., Pawlotsky, J., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L., Thiel, H., Viazov, S., Weiner, A., and Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42(4), 962-973.

Snapper, C., Peschel, C., and Paul, W. (1988). IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 140(7), 2121-2127.

Spahn, C. M. T., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C Virus IRES RNA-Induced Changes in the Conformation of the 40S Ribosomal Subunit. *Science* 291(5510), 1959-1962.

Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R. H., Schultz, P. G., and Chisari, F. V. (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *PNAS* 99(24), 15669-15674.

Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J. L., Manns, M. P., and Rehermann, B. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med.* 6(5), 578-582.

Tellinghuisen, T., and Rice, C. (2002). Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol.* 5(4), 419-27.

Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E., and Rice, C. M. (2004). The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 279(47), 48576-48587.

The Global Burden of Hepatitis C Working Group (2004). Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C. *J Clin Pharmacol.* 44(1), 20-29.

Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H., and Chisari, F. V. (2002). Inaugural Article: Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *PNAS* 99(24), 15661-15668.

Thomas, D., Villano, S., Riester, K., Hershow, R., Mofenson, L., Landesman, S., Hollinger, F., Davenport, K., Riley, L., Diaz, C., Tang, H., and Quinn, T. (1998). Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J. Infect Dis.* 177(6), 1480-8.

- Toniutto, P., Fabris, C., Bitetto, D., Fornasiere, E., Rapetti, R., and Pirisi, M. (2007). Valopicitabine dihydrochloride: a specific polymerase inhibitor of hepatitis C virus. *Curr Opin Investig Drugs* 8(2), 150-8.
- Troesch, M., Jalbert, E., Canobio, S., Boulassel, M., Routy, J., Bernard, N., Bruneau, J., Lapointe, N., Boucher, M., and Soudeyins, H. (2005). Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* 19(8), 775-84.
- Troesch, M., Meunier, I., Lapierre, P., Lapointe, N., Alvarez, F., Boucher, M., and Soudeyins, H. (2006). Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352(2), 357-367.
- Tsai, S., Liaw, Y., Chen, M., Huang, C., Kuo, GC. (1997). Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 25(2), 449-458.
- Tsao, M.-L., Chao, C.-H., and Yeh, C.-T. (2006). Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348(1), 271-277.
- Urbani, S., Amadei, B., Fisicaro, P., Tola, D., Orlandini, A., Sacchelli, L., Mori, C., Missale, G., and Ferrari, C. (2006). Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 44(1), 126-139.
- Vajdy, M., Selby, M., Medina-Selby, A., Coit, D., Hall, J., Tandeske, L., Chien, D., Hu, C., Rosa, D., Singh, M., Kazzaz, J., Nguyen, S., Coates, S., Ng, P., Abrignani, S., Lin, Y.-L., Houghton, M., and O'Hagan, D. T. (2006). Hepatitis C virus polyprotein vaccine formulations capable of inducing broad antibody and cellular immune responses. *J Gen Virol.* 87(8), 2253-2262.
- Vassilaki, N., and Mavromara, P. (2003). Two Alternative Translation Mechanisms Are Responsible for the Expression of the HCV ARFP/F/Core+1 Coding Open Reading Frame. *J. Biol. Chem.* 278(42), 40503-40513.
- Viropharma, communiqué de presse. 2006-10-24. ViroPharma and Wyeth Initiate Dosing in Phase 2 Study of HCV-796 in Treatment Naive Patients and Non-Responders.
- Voisset, C., and Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell.* 96(6), 413-20.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.-G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 11(7), 791-796.
- Walewski, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D., and Branch, A. D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7(5), 710-721.

Walewski, J. L., Gutierrez, J. A., Branch-Elliman, W., Stump, D. D., Keller, T. R., Rodriguez, A., Benson, G., and Branch, A. D. (2002). Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA* 8(5), 557-571.

Ward, S. e. a. (2002). Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clinical Experimental Immunology* 128, 195-203.

Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H.-G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E., and Moradpour, D. (2000). Subcellular Localization, Stability, and trans-Cleavage Competence of the Hepatitis C Virus NS3-NS4A Complex Expressed in Tetracycline-Regulated Cell Lines. *J. Virol.* 74(5), 2293-2304.

Woollard, D., Grakoui, A., Shoukry, N., Murthy, K., Campbell, K., and Walker, C. (2003). Characterization of HCV-specific Patr class II restricted CD4<sup>+</sup> T cell responses in an acutely infected chimpanzee. *Hepatology* 38(5), 1297-1306.

Xu, Z., Choi, J., Yen, T., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M., and Ou, J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* 20(14), 3840-8.

Xu, Z., Choi, J., Lu, W., and Ou, J.-h. (2003). Hepatitis C Virus F Protein Is a Short-Lived Protein Associated with the Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.* 77(2), 1578-1583.

Yi, M., Villanueva, R. A., Thomas, D. L., Wakita, T., and Lemon, S. M. (2006). From the Cover: Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *PNAS* 103(7), 2310-2315.

Youn, J., Park, S.-H., Lavillette, D., Cosset, F., Yang, S.-H., Lee, C., Jin, H., Kim, C., Shata, M., Lee, D., Pfahler, W., Prince, A., and Sung, Y. (2005). Sustained E2 antibody response correlates with reduced peak viremia after hepatitis C virus infection in the chimpanzee. *Hepatology* 42(6), 1429-1436.

Yu, H., Babiuk, L. A., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2004). Priming with CpG-enriched plasmid and boosting with protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides and Quil A induces strong cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol.* 85(6), 1533-1543.

Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2004). CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *J. Virol.* 78(3), 1448-1455.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., and Chisari, F. V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *PNAS* 102(26), 9294-9299.

**ANNEXE 1 – Données ELISA vaccin protéique. Protocoles 1-4.**

# Protocole d'immunisation vaccin protéique 1

[illegible]

TP 1	06/07/2005														
	Souris														
Dilution	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
1/50	0.732	0.272	0.75	0.293	0.231	0.965	0.137	0.916	0.132	0.13	0.186	0.049	0.046	0.048	0.045
1/100	0.306	0.117	0.197	0.157	0.138	0.89	0.113	0.742	0.112	0.116	0.105	0.045	0.053	0.048	0.046
1/200	0.165	0.113	0.166	0.127	0.16	0.815	0.108	0.441	0.107	0.111	0.107	0.102	0.798	0.116	0.123
1/400	0.147	0.11	0.154	0.121	0.117	0.677	0.11	0.328	0.107	0.105	0.115	0.101	0.279	0.103	0.12
1/800	0.124	0.106	0.137	0.123	0.125	0.454	0.105	0.219	0.099	0.106	0.106	0.097	0.273	0.106	0.106
1/1600	0.12	0.118	0.119	0.118	0.12	0.59	0.104	0.171	0.105	0.108	0.103	0.096	0.223	0.11	0.11
Titre	50	0	50	0	0	400	0	100	0	0	0	0	0	0	0

## TP 1 06/07/2005

[illegible]TP 2  
28/07/2005[illegible]

## TP 2 28/07/2005

[illegible]

## TP 3 19/09/2005

TP 3 19/09/2005

Souris

Dilution	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
1/50	2.023	2.008	1.658	1.054	1.709	1.411	1.314	1.736	2.224	1.741	1.006	1.424	1.613	1.434	1.373
1/100	2.028	1.542	1.83	1.646	1.839	1.829	1.483	2.139	1.904	1.714	1.872	1.79	1.912	1.489	1.88
1/200	2.202	2.602	1.876	1.837	1.805	2.091	1.948	2.168	2.422	1.54	1.773	1.658	1.724	1.471	2.006
1/400	2.376	2.547	1.889	1.913	1.776	2.225	1.925	2.356	2.456	1.266	1.783	1.907	1.312	1.223	1.919
1/800	2.49	1.574	1.874	1.814	1.617	2.117	1.671	1.664	2.196	0.928	1.825	2.059	1.478	1.136	2.197
1/1600	2.209	1.97	2.157	1.987	1.674	2.269	1.574	1.671	1.659	0.648	1.749	2.062	1.233	1.157	1.672
<b>Titre</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>800</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>

## TP 3 19/09/2005

TP 3 19/09/2005

Souris

[illegible]



Contôles		Contrôle1	Contrôle2	Contrôle3	Contrôle4	Contrôle5	Contrôle
dilutions	Ag	0	0	pF	pF	pF	pF
	Ac1	0	Ac serum 31 TP4	Ac serum 31 TP4	0	Ac lapin 35	Ac serum 31 TP4
	Ac2	0	Anti-IgG de souris phosphatase	0	Anti-IgG de souris phosphatase	Anti-IgG de lapin phosphatase	Anti-IgG d'humain phosphatase
1/50	DO	0.131	0.29	0.136	0.194	1.759	0.157
1/100		0.125	0.125	0.125	0.127	1.333	0.118
1/200		0.109	0.147	0.121	0.106	1.494	0.104
1/400		0.102	0.128	0.116	0.11	1.41	0.113
1/800		0.113	0.131	0.11	0.109	1.127	0.102
1/1600		0.108	0.131	0.117	0.109	1.974	0.144
titres		0	0	0	0	1600	0

Souris 31-45 ont été immunisées avec l'ARFP. Souris 1-10 ont été immunisées avec du PBS.

**Protocole d'immunisation vaccine protéique 2**

**25/08/200**

**TP 0**

**5**

**Souris**

Dilution	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	21	22	23	24	25
1/50	0.166	0.236	0.243	0.247	0.208	0.206	0.205	0.217	0.211	0.209	0.199	0.218	0.323	0.278	0.229
1/100	0.115	0.161	0.161	0.145	0.134	0.132	0.142	0.127	0.128	0.115	0.174	0.208	0.186	0.171	0.152
1/200	0.123	0.15	0.128	0.136	0.114	0.111	0.121	0.113	0.113	0.104	0.117	0.136	0.164	0.144	0.14
1/400	0.132	0.164	0.114	0.118	0.116	0.121	0.133	0.115	0.104	0.11	0.12	0.128	0.191	0.138	0.126
1/800	0.119	0.138	0.113	0.118	0.115	0.117	0.128	0.115	0.108	0.103	0.105	0.123	0.134	0.137	0.114
1/1600	0.138	0.122	0.109	0.11	0.109	0.116	0.124	0.108	0.106	0.107	0.105	0.119	0.129	0.127	0.114
<b>Titre</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**25/08/200**

**TP 0**

**5**

**Souris**

Dilution	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	26	27	28	30
1/50	0.283	0.247	0.68	0.158	0.144	0.164	0.141	0.16	0.187	0.297	0.441	0.32	0.325	0.353
1/100	0.162	0.13	0.31	0.128	0.115	0.116	0.114	0.117	0.128	0.213	0.258	0.184	0.197	0.227
1/200	0.132	0.12	0.211	0.126	0.105	0.107	0.102	0.105	0.122	0.197	0.188	0.139	0.161	0.146
1/400	0.128	0.119	0.173	0.121	0.111	0.107	0.109	0.113	0.114	0.161	0.151	0.131	0.136	0.135
1/800	0.116	0.119	0.168	0.116	0.107	0.112	0.106	0.106	0.11	0.164	0.134	0.128	0.134	0.123
1/1600	0.116	0.121	0.153	0.122	0.109	0.11	0.107	0.107	0.109	0.131	0.127	0.118	0.122	0.121
<b>Titre</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**08/09/200**

**TP1**

**5**

**Souris**

Dilution	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	21	22	23	24	25
1/50	0.37	0.625	0.303	0.339	0.421	3.852	0.552	0.27	2.758	0.505	over	0.189	3.567	over	over
1/100	0.187	0.306	0.155	0.164	0.156	1.842	0.204	0.153	0.56	0.191	3.323	0.141	3.184	over	1.876
1/200	0.168	0.183	0.128	0.126	0.133	1.337	0.149	0.124	0.295	0.144	2.201	0.112	3.227	over	1.851
1/400	0.173	0.152	0.136	0.129	0.122	0.777	0.133	0.123	0.204	0.131	1.212	0.111	1.433	2.473	0.736
1/800	0.156	0.13	0.123	0.121	0.121	0.539	0.125	0.124	0.173	0.122	0.622	0.113	0.79	2.199	0.427
1/1600	0.137	0.126	0.118	0.122	0.119	0.546	0.125	0.146	0.154	0.115	0.337	0.113	0.462	1.296	0.271
<b>Titre</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>200</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>400</b>	<b>0</b>	<b>400</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>200</b>

## 08/09/200

**TP1**



## Souris

[illegible]

## 23/09/200

TP2

5

## Souris

Dilution		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	21	22	23	24	25
1/50	3.831	3.849	3.373	3.573	2.987	2.874	2.626	3.47	3.517	1.225	3.635	0.801	3.936	3.926	3.926	Over
1/100	3.525	3.898	2.898	1.264	0.982	1.468	1.197	2.613	1.648	0.56	Over	0.304	3.959	3.978	3.978	Over
1/200	2.387	3.359	1.364	1.013	0.684	0.906	0.657	3.189	1.518	0.303	3.924	0.24	3.936	3.853	3.853	Over
1/400	1.91	2.646	1.019	0.83	0.473	0.493	0.397	3.666	1.315	0.291	3.086	0.174	3.874	3.765	3.765	Over
1/800	1.316	1.965	0.647	0.556	0.366	0.536	0.266	3.106	1.194	0.218	Over	0.188	3.874	3.903	3.903	3.429
1/1600	0.77	1.96	0.558	0.428	0.284	0.513	0.298	3.423	1.055	0.187	3.573	0.266	3.907	3.939	3.939	3.21
<b>Titre</b>	<b>800</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>400</b>	<b>200</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>50</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>0</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>

## 23/09/200

TP2

5

## Souris

[illegible]

Souris															
Dilution	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	21	22	23	24	25
1/50	3.593	3.623	2.931	3.934	3.865	over	3.796	3.843	3.456	3.855	3.717	3.534	3.636	3.78	3.783
1/100	3.071	3.581	2.555	3.459	Over	Over	3.873	3.848	3.622	3.966	1.524	2.193	3.518	2.628	3.952
1/200	1.902	1.744	1.431	2.418	2.646	Over	3.807	3.818	3.641	3.184	3.74	1.047	2.844	2.829	3.142
1/400	1.187	1.526	0.987	1.257	2.378	Over	3.802	3.891	3.742	3.885	3.66	1.001	3.548	3.151	3.752
1/800	1.11	1.341	0.818	1.093	2.236	Over	3.867	3.833	3.665	3.171	3.717	0.856	3.406	3.707	3.62
1/1600	1.589	1.086	1.084	0.771	1.427	Over	3.813	3.843	3.612	3.055	3.832	0.51	3.562	3.78	3.976
<b>Titre</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>800</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>800</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>

[illegible]

Contrôles de l'ELISA

dilutions	Ag	Contrôle1 pF	Contrôle2 pF	Contrôle3 pF	Contrôle4 pF
	Ac1	Ac lapin 35	0	Ac serum 30 TP3	Ac serum 30 TP3
	Ac2	Anti-IgG de lapin phosphatase	Anti-IgG de souris phosphatase	0	Anti-IgG d'humain phosphatase
1/50	DO	3.926	0.131	0.268	0.174
1/100		3.918	0.129	0.155	0.158
1/200		3.916	0.108	0.135	0.156
1/400		3.748	0.111	0.123	0.155
1/800		3.733	0.112	0.122	0.149
1/1600		3.017	0.111	0.135	0.181
titres		1600	0	0	0

**Cut off : 0.268 x 3 = 0.804**

Souris 1-10 et 21-25 ont été immunisées avec l'ARFP. Souris 1-5 ont été challengées avec WR; souris 6-10 ont été challengées avec VVF; souris 21-25 avec du PBS. Souris 11-20 et 26-30 ont été immunisées avec du PBS. Souris 11-15 ont été challengées avec WR; souris 16-20 ont été challengées avec VVF; souris 26-30 avec du PBS.

**Protocole d'immunisation vaccin protéique 3**

**07/11/200**

**TP 0 5**

Souris

Dilution	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1/50	0.204	0.185	0.169	0.212	0.147	0.164	0.212	0.162	0.127	0.179	0.141	0.21	0.245	0.246	0.273
1/100	0.1	0.146	0.12	0.121	0.118	0.129	0.147	0.119	0.111	0.114	0.12	0.131	0.127	0.147	0.269
1/200	0.114	0.117	0.11	0.111	0.111	0.121	0.136	0.111	0.109	0.109	0.11	0.113	0.121	0.126	0.13
1/400	0.101	0.121	0.109	0.11	0.108	0.119	0.131	0.111	0.109	0.108	0.11	0.107	0.116	0.119	0.115
1/800	0.1	0.116	0.106	0.112	0.111	0.113	0.121	0.109	0.106	0.131	0.109	0.122	0.111	0.119	0.11
1/1600	0.169	0.109	0.105	0.113	0.123	0.114	0.122	0.109	0.107	0.109	0.11	0.108	0.152	0.119	0.109
<b>Titre</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**07/11/200**

**TP 0 5**

Souris

Dilution	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1/50	0.155	0.204	0.192	0.171	0.152	0.153	0.192	0.258	0.159	0.158	0.184	0.184	0.168	0.156	0.159
1/100	0.124	0.123	0.141	0.139	0.124	0.131	0.134	0.203	0.162	0.122	0.137	0.138	0.13	0.134	0.125
1/200	0.121	0.12	0.124	0.126	0.116	0.115	0.117	0.149	0.157	0.105	0.125	0.114	0.157	0.117	0.121
1/400	0.111	0.117	0.118	0.133	0.111	0.112	0.112	0.135	0.121	0.103	0.121	0.117	0.116	0.114	0.118
1/800	0.11	0.136	0.11	0.127	0.109	0.111	0.114	0.12	0.229	0.098	0.117	0.113	0.116	0.119	0.113
1/1600	0.109	0.137	0.093	0.123	0.11	0.113	0.117	0.114	0.11	0.098	0.111	0.109	0.112	0.112	0.113
<b>Titre</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**21/11/200**

**TP 1 5**

Souris

Dilution	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1/50	0.612	0.886	0.399	0.153	0.143	0.65	0.15	0.886	0.769	0.809	0.617	0.514	0.783	0.144
1/100	0.419	0.815	0.21	0.128	0.12	0.348	0.142	0.815	0.667	0.873	0.483	0.235	0.341	0.118
1/200	0.297	0.715	0.154	0.114	0.12	0.242	0.113	0.675	0.439	0.791	0.329	0.159	0.237	0.113
1/400	0.222	0.578	0.134	0.114	0.112	0.247	0.132	0.567	0.322	0.636	0.242	0.126	0.2	0.113
1/800	0.17	0.454	0.125	0.109	0.117	0.165	0.115	0.436	0.251	0.557	0.205	0.119	0.156	0.106
1/1600	0.157	0.318	0.115	0.109	0.106	0.122	0.095	0.379	0.189	0.401	0.152	0.12	0.135	0.111
<b>Titre</b>	<b>0</b>	<b>200</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>200</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>0</b>

## Souris

[illegible]

## Souris

Souris															
Dilution	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
1/50	0.843	0.888	0.703	0.279	0.709	0.661	0.265	0.705	0.686	0.536	0.669	0.841	0.606	0.541	
1/100	0.884	0.957	0.768	0.183	0.786	0.807	0.151	0.877	0.832	0.742	0.619	0.766	0.791	0.86	
1/200	0.887	0.96	0.715	0.122	0.748	0.816	0.135	0.812	0.769	0.775	0.469	0.766	0.767	0.852	
1/400	0.889	0.682	0.559	0.117	0.672	0.777	0.125	0.772	0.774	0.784	0.406	0.742	0.699	0.796	
1/800	0.802	0.601	0.441	0.112	0.578	0.71	0.122	0.713	0.76	0.703	0.291	0.701	0.619	0.719	
1/1600	0.686	0.51	0.346	0.111	0.479	0.709	0.122	0.619	0.624	0.622	0.221	0.639	0.536	0.641	
Titre	1600	400	200	0	400	1600	0	800	800	800	0	1600	400	1600	

## Souris

[illegible]

## Souris

Souils													
Dilution	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1/50	0.786	0.791	0.548	0.695	0.832	0.784	0.786	0.695	0.552	0.602	0.71	0.541	0.49
1/100	0.885	0.713	0.321	1.385	1.361	1.066	0.889	0.872	0.0483	0.746	0.822	0.731	0.721
1/200	0.997	0.591	0.223	0.872	0.858	0.804	0.764	0.855	0.398	0.773	0.793	0.703	0.729
1/400	0.76	0.481	0.185	0.75	0.737	0.784	0.657	0.835	0.322	0.742	0.766	0.663	0.729
1/800	0.66	0.369	0.149	0.776	0.602	0.643	0.547	0.766	0.241	0.687	0.985	0.671	1.085
1/1600	0.562	0.263	0.134	0.968	0.492	0.572	0.457	0.753	0.186	0.574	0.694	0.508	0.619
Titre	800	100	0	1600	400	800	400	1600	0	800	1600	800	800

## Souris

[illegible]



**Protocole d'immunisation vaccin protéique 3 : répétition**

**TP 0 07/11/2005**

Souris		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Dilution		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1/50		0.201	0.154	0.137	0.17	0.151	0.241	0.154	0.127	0.124	0.131	0.131	0.132	0.258
1/100		0.141	0.215	0.152	0.149	0.136	0.143	0.138	0.135	0.123	0.128	0.12	0.117	0.186
1/200		0.155	0.173	0.194	0.147	0.136	0.137	0.14	0.132	0.125	0.136	0.136	0.123	0.148
1/400		0.142	0.156	0.146	0.134	0.134	0.149	0.155	0.132	0.121	0.127	0.127	0.12	0.135
1/800		0.117	0.152	0.146	0.141	0.129	0.138	0.153	0.129	0.116	0.122	0.122	0.127	0.118
1/1600		0.129	0.186	0.14	0.129	0.137	0.137	0.144	0.128	0.12	0.122	0.122	0.123	0.119
<b>Titre</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**TP 1 21/11/2005**

Souris		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Dilution		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1/50		0.712	0.254	0.204	0.137	0.38	0.142	0.776	0.648	0.8	0.547	0.127	0.634	0.227
1/100		0.492	0.188	0.186	0.135	0.231	0.125	0.744	0.453	0.724	0.387	0.121	0.402	0.183
1/200		0.277	0.151	0.143	0.123	0.186	0.134	0.635	0.33	0.613	0.285	0.124	0.245	0.222
1/400		0.229	0.136	0.128	0.14	0.153	0.142	0.533	0.248	0.503	0.215	0.12	0.19	0.207
1/800		0.221	0.154	0.129	0.127	0.141	0.219	0.439	0.255	0.398	0.174	0.12	0.171	0.174
1/1600		0.148	0.137	0.128	0.126	0.134	0.157	0.352	0.161	0.308	0.146	0.117	0.14	0.136
<b>Titre</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>400</b>	<b>50</b>	<b>200</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>0</b>

**TP 2 07/12/2005**

Souris		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Dilution		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1/50		0.865	0.837	0.26	0.864	0.846	0.231	0.666	0.727	0.702	0.808	0.861	0.884	0.848
1/100		0.861	0.903	0.248	0.799	0.893	0.137	0.814	0.831	0.855	0.667	0.82	1.068	0.985
1/200		0.854	0.728	0.169	0.71	0.86	0.127	0.831	0.859	0.896	0.571	0.83	0.845	0.773
1/400		0.759	0.619	0.138	0.647	0.811	0.125	0.795	0.849	0.849	0.391	0.835	0.851	0.737
1/800		0.669	0.5	0.141	0.553	0.701	0.121	0.734	0.805	0.761	0.299	0.782	0.719	0.619
1/1600		0.528	0.491	0.128	0.477	0.636	0.12	0.653	0.739	0.658	0.22	0.71	0.585	0.524
<b>Titre</b>	<b>1600</b>	<b>400</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>800</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>0</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>200</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>800</b>

**TP 3 04/01/2006**

**Souris**

Dilution	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1/50	0.817	0.72	0.408	0.764	0.852	0.799	0.822	0.695	0.68	0.806	0.916	0.694	0.689
1/100	0.872	0.66	0.205	0.824	0.851	0.836	0.805	0.802	0.617	0.969	1.03	0.932	0.942
1/200	0.844	0.647	0.16	0.815	0.715	0.78	0.715	0.827	0.517	1.032	1.113	0.909	0.926
1/400	0.746	0.477	0.181	0.81	0.6	0.711	0.628	0.823	0.42	1.059	0.938	0.957	0.92
1/800	0.632	0.398	0.151	0.753	0.509	0.599	0.503	0.767	0.347	0.884	0.868	0.95	0.862
1/1600	0.61	0.277	0.141	0.688	0.401	0.536	0.389	0.691	0.262	0.76	0.747	0.774	0.775
<b>Titre</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>200</b>	<b>0</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>400</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>400</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>100</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>	<b>&gt;1600</b>

**Contrôles**

Dilution	rARFP + pas de sérum + chèvre anti-souris Ac 2°	rARFP + pas de sérum + pas d'Ac 2°	rARFP + souris PBS + chèvre anti-souris Ac 2°	rARFP + anti- ARFP + chèvre anti-souris Ac 2°	rARFP + anti-F (Branch) + chèvre anti- souris Ac 2°
1/50	0.149	0.131	<b>0.176</b>	0.491	0.548
1/100	0.131	0.132	0.143	0.501	0.561
1/200	0.132	0.138	0.145	0.523	0.563
1/400	0.132	0.175	0.141	0.553	0.583
1/800	0.139	0.137	0.132	0.558	0.531
1/1600	0.141	0.157	0.122	0.572	0.449

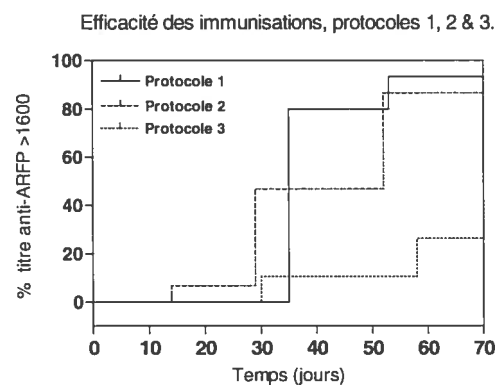
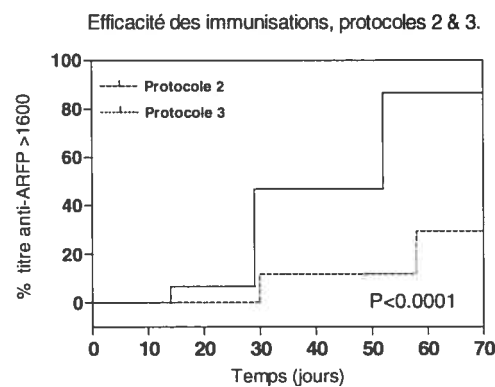
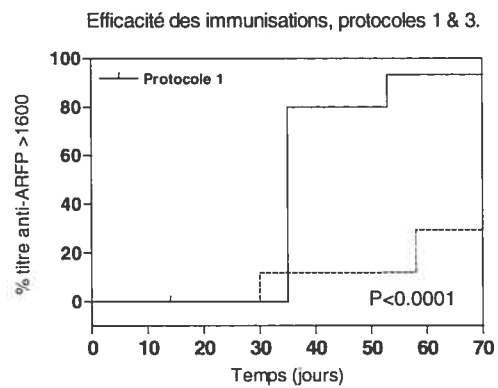
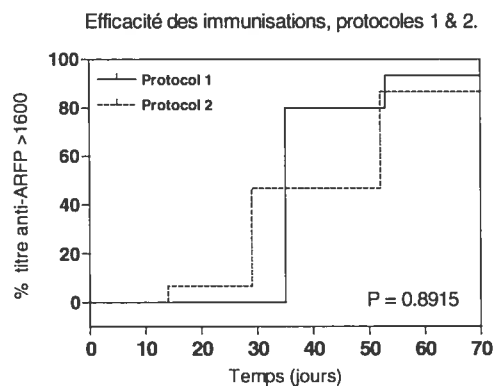
**Cut off = 3 x 0.176  
= 0.528**

Souris 21-35 ont été immunisées avec l'ARFP. Souris 21-25 ont été challengées avec VVF; souris 26-30 ont été challengées avec WR; souris ont été challengées avec PBS.

**ANNEXE 2 – Comparaison des courbes d'efficacité d'immunisation  
pour le vaccin protéique. Protocoles 1-3.**

## Annexe 2 : Comparaison des courbes d'efficacité d'immunisation pour le vaccin protéique

Évaluation de l'efficacité des immunisations, protocole 1, 2 & 3.



**ANNEXE 3 – Comparaison des résultats obtenus par test de plaque et  
qPCR. Protocoles 3 et 4.**

### Annexe 3 : Comparaison des résultats obtenus par test de plaque et par qPCR

#### Protocole 3

Souris	Ovaire droit - plaques	Ovaire droit - qPCR	Ovaire gauche - plaques	Ovaire gauche - qPCR
1 (PBS + PBS)	0	x	0	x
2 (PBS + PBS)	0	x	0	x
3 (PBS + PBS)	0	x	0	x
9 (PBS + WR)	4.83E+07	9.66E+09	6.83E+07	1.37E+10
10 (PBS + WR)	9.24E+06	1.85E+09	2.08E+07	4.16E+09
16 (PBS + VVF)	0	aucune bande	2.13E+07	4.26E+09
17 (PBS + VVF)	4.08E+05	aucune bande	1.63E+07	3.26E+09
18 (PBS + VVF)	8.51E+06	aucune bande	4.65E+06	9.30E+08
19 (PBS + VVF)	3.75E+07	7.50E+09	1.60E+06	3.20E+08
20 (PBS + VVF)	3.18E+06	6.36E+08	4.33E+04	aucune bande
22 (rARFP + VVF)	1.67E+04	3.34E+06	0	aucune bande
23 (rARFP + VVF)	3.63E+06	7.26E+08	1.92E+04	aucune bande
24 (rARFP + VVF)	3.33E+04	6.66E+06	2.78E+06	5.56E+08
25 (rARFP + VVF)	3.23E+05	6.46E+07	6.50E+04	aucune bande
26 (rARFP + WR)	1.08E+08	2.16E+10	8.67E+07	1.73E+10
27 (rARFP + WR)	1.04E+08	2.08E+10	1.32E+08	2.64E+10
28 (rARFP + WR)	1.67E+08	3.34E+10	3.92E+07	7.84E+09
29 (rARFP + WR)	1.21E+08	2.42E+10	3.17E+08	6.34E+10
30 (rARFP + WR)	6.33E+07	1.27E+10	1.02E+09	2.04E+11
31 (rARFP + PBS)	0	x	0	x
32 (rARFP + PBS)	0	x	0	x
33 (rARFP + PBS)	0	x	0	x
34 (rARFP + PBS)	0	x	0	x

### Annexe 3 : Comparaison des résultats obtenus par test de plaque et par qPCR

#### Protocole 4

Souris	Ovaire droit - plaques	Ovaire droit - qPCR	Ovaire gauche - plaques	Ovaire gauche - qPCR
51 (PBS + PBS)	0	x		x
52 (PBS + PBS)	0	x		x
11 (PBS + VVF)	8.17E+07	5.87E+07	4.83E+05	aucune bande
12 (PBS + VVF)	4.06E+07	aucune bande	1.33E+07	bande faible
13 (PBS + VVF)	1.04E+07	aucune bande	0	aucune bande
14 (PBS + VVF)	7.77E+05	3.67E+07	1.14E+06	aucune bande
6 (PBS + WR)	0	aucune bande	0	aucune bande
7 (PBS + WR)	2.57E+08	2.07E+08	2.47E+07	2.00E+08
8 (PBS + WR)	1.66E+08	2.13E+08	6.08E+05	aucune bande
26 (rARFP + PBS)	0	x	0	x
28 (rARFP + PBS)	0	x	0	x
29 (rARFP + PBS)	0	x	0	x
30 (rARFP + PBS)	0	x	0	x
21 (rARFP + VVF)	1.06E+07	aucune bande	1.67E+04	aucune bande
22 (rARFP + VVF)	2.18E+07	3.67E+07	0	aucune bande
23 (rARFP + VVF)	1.05E+08	9.18E+07	5.25E+04	bande faible
24 (rARFP + VVF)	0	aucune bande	8.33E+04	aucune bande
25 (rARFP + VVF)	2.32E+06	aucune bande	6.67E+04	aucune bande
26 (rARFP + WR)	7.05E+06	2.56E+07	8.08E+05	bande faible
27 (rARFP + WR)	1.47E+08	9.18E+07	3.67E+05	bande faible
28 (rARFP + WR)	1.44E+08	9.18E+07	1.04E+06	aucune bande
29 (rARFP + WR)	0	aucune bande	0	aucune bande
30 (rARFP + WR)	1.50E+07	aucune bande	1.42E+05	aucune bande

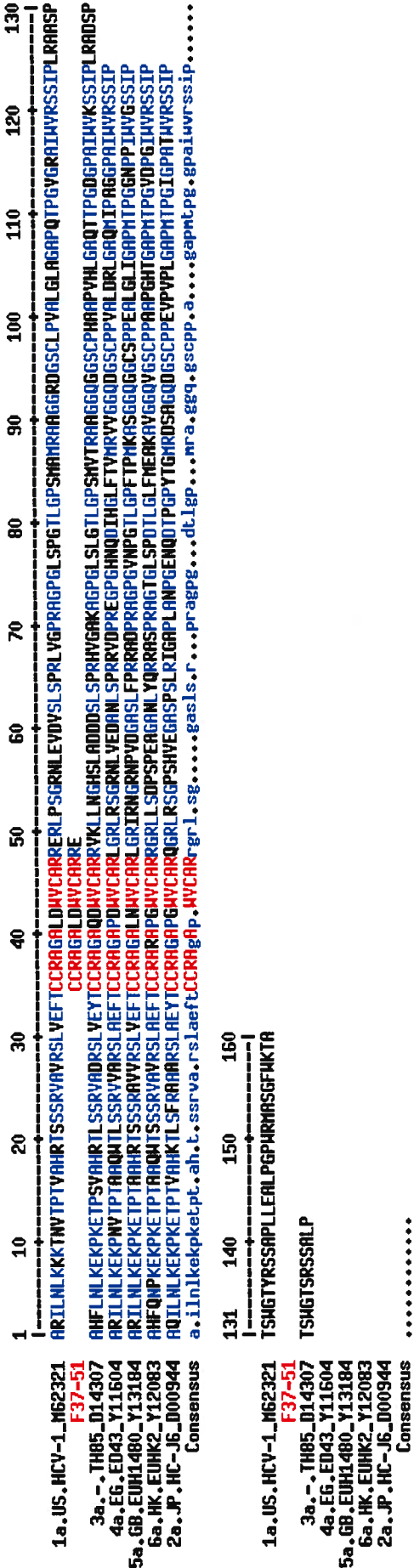
Les « x » indiquent que le test qPCR n'a pas été fait sur cet échantillon.

**ANNEXE 4 – Analyse des peptides F37-51 et F101-115 par génotype de  
VHC**



Annexe 4 : Analyse de l'ARFP par génotype de VHC

Peptide F37-51 (CCRAGALWVDCARRE)



Peptide F101-115 (PVALGLAGAPQTPGV)

